

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE LA NUTRITION AZOTÉE
DE LA CELLULE VIVANTE**
ASSIMILATION DE LA MOLECULE NITRIQUE
PAR L'ASPERGILLUS REPENS *DE BARY*

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

**Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)**

présentée et soutenue le 1935

par

Jean DESBORDES

JURY... { MM. LUTZ, *Président*
BACH, *Professeur*
MASCRÉ, *Agrégé*

PARIS
LES PRESSES MODERNES
96, GALERIES BEAUJOLAIS

1935

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ☼ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☼ I.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. ✱, ☼ I.....	Botanique générale.
PERROT, O. ✱, ☼ I.....	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIERE, O. ✱, ☼ I.....	Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ☼ I.....	Pharmacie chimique.
BOUGAULT O. ✱, ☼ I.....	Chimie analytique.
GORIS, O. ✱, ☼ I.....	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ☼ I.....	Physique.
DAMIENS, ✱, ☼ I.....	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱, ☼ I.....	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☼ I.....	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☼ I.....	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, O. ✱, ☼ I.....	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☼ I.....	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☼ I.

Professeurs honoraires : MM. BEHAL, G. O. ✱, ☼ I.,
DELEPINE, O. ✱., ☼ I., membre de l'Institut.
GUERBET, ✱, ☼ I.

CHARGÉS DE COURS

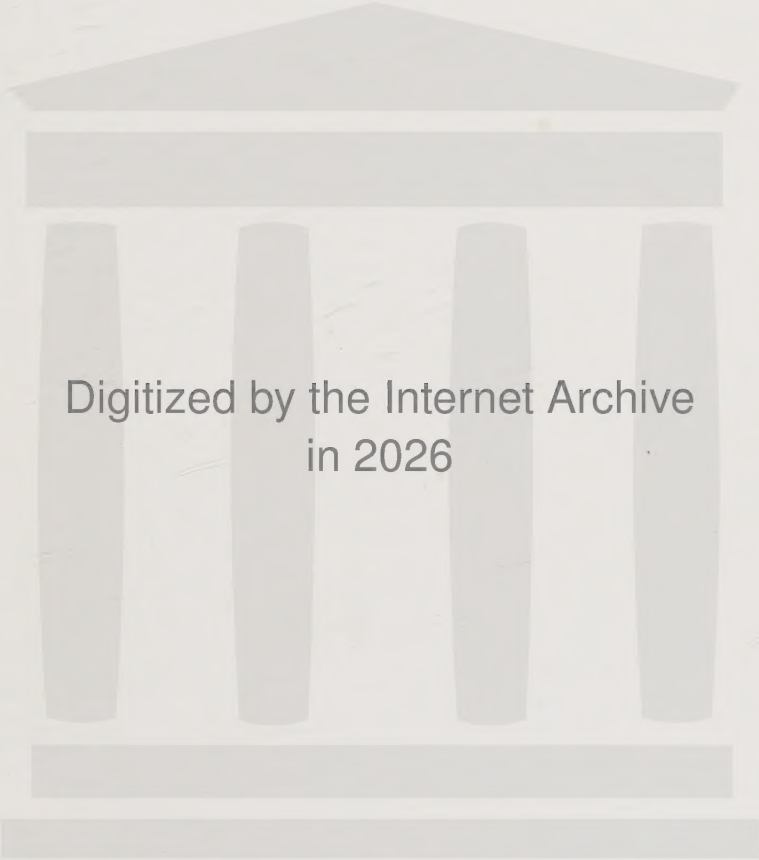
MM. Marc HONNORAT ✱, ☼ I. Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. ✱, ☼ I... Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ☼ I..... Hydrologie et Hygiène.
PICON, ☼ I..... Chimie minérale et Minéralogie.
BACH, ☼ I..... Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ✱, ☼ I.	MM. BACH, ☼ I.
PICON, ☼ I.	BEDEL, ☼ I.
MASCRE, ☼ I.	RÉGNIER, ☼ I.
FLEURY, ☼ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☼ I., *agrégé*, chargé des T. P. de 1^{re} année Chimie générale.
FLEURY, ☼ I., et RÉGNIER, ☼ I., *agrégés*, chargés des travaux de..... Chimie analytique.
SOUEGES, ☼ I..... Micrographie.
LEROUX, ☼ I..... Physique.
DEVAL, ✱, ☼ I..... Microbiologie.
DELABY, ✱, ☼ I., PICON, ☼ I., et MASCRE, ☼ I. :
agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.
Bibliothécaire en Chef : M. BERNARD, ☼ I.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ERRATUM

- Page 7, au lieu de Repens, lire repens (2^e paragraphe, 3^e ligne).
 Page 9, au lieu de « le fait », lire « la nécessité » (15^e ligne).
 Page 10, au lieu de « Pyrenoïda », lire « pyrenoïdea » (3^e ligne).
 Page 14, au lieu de « général » lire « générale » (avant-dernier paragraphe).
 Pages 16 et 17, dans toute la page et sur le tableau, au lieu de « nitrate » et « nitrate alcalin », lire « acide nitrique ».
 Page 17, ajouter la note suivante : « Le poids moléculaire exact de NO^3H est en réalité de 630 et non de 640 ce qui entraîne une légère différence dans le calcul des restes de dissociation ».
 Page 17, au lieu de « base forte », lire « relativement faible » (1^e ligne après le tableau).
 Page 18, au lieu de « biens », lire « bien » (dernière ligne).
 Page 19, au lieu de « ...bases facilement mises... », lire « base facilement mise... » (18^e ligne).
 Page 19, au lieu de BANDISCH, lire BAUDISCH (1^e ligne, avant-dernier §).
 Page 20, lire « passe » au lieu de « passent » (1^e ligne).
 » au lieu de H.CHOH , lire H.CO.H .
 » au lieu de ...passage direct de NO^3H à ce corps... lire passage direct de NO^3H à HCN ...
 Page 21, au lieu de R.NH^3 lire R.NH^2 .
 Page 22, dans la 1^e note, 2^e paragraphe, au lieu de ...electrolyse, lire ...électrophorèse. et de son radical, lire ...il...
 Page 23, 1^e ligne, au lieu de renversement, lire minimum et au lieu de protéine -, lire protéine +, et au lieu de protéine+ lire protéine - (dans le schéma).
 Page 24, 14^e ligne, au lieu de ...des résidus carbonés à forme amino-acide, lire ...des résidus carbonés conduisant à des formes aminoacides.
 Page 34, (voir la note à la page 17).
 Page 35, dans la courbe, lire 1 au lieu de 100.
 Page 37, lire racemosa et non racemosus (3^e nom latin au haut de la page).
 Page 48, au dernier paragraphe, lire : « Le tube A (fig. 4) » et non « Le tube (fig. 4) » (1^e ligne) et lire « le tube B » et non « le tube (b) » (7^e ligne).
 Page 59, au lieu de « destruction », lire « disparition » (4^e ligne à partir du bas).
 Page 75, au lieu de réglée, lire réglé (9^e ligne).
 Page 78. (note), lire Asp. oryzoë, au lieu de cryzoe.
 Page 87, au lieu de « l'ion NO^3 a lieu », lire « l'ion NO^3 est placé » (3^e paragraphe).
 Page 96. (2^e paragraphe), lire $\text{pH} = 11$ au lieu de $p = 11$, et au lieu de ...augmentent constamment avec le pH pour... lire « augmente constamment pour », et 8^e ligne, lire « est » et non « et ».
 Page 98, lire « ...cellule lui permettent » et non « leur permettent » (11^e ligne).
 Page 98, lire ...rejette au lieu de ...rejettera (dernière ligne).
 Page 112, lire, au lieu d'un, et non au lieu de un (11^e ligne).
 Page 133, au lieu de mis en évidence, lire mise en... (dernier paragraphe, 2^e ligne).
 Page 135, au lieu de Guillermondii, lire Guillermondii ; Nidulens, lire Nidulans ; Cineria, lire Cinerea.
 Page 138, dans le tableau les chiffres de la deuxième ligne sont erronés.
 Page 139 et suivantes, lire Mucor Boulardii et M. Guillermondii.
 Page 141, dans le tableau, sur la première ligne, lire 0.04 et non 3.04.
 A partir de la page 145 lire toujours Rhyzopus et non Rysopus, et cinerea à la place de cineria ;
 Dans tout le texte, lire toujours Penicillium et non Penicilium.
 Page 155, lire Absidia racemosa et non A. ramosa.
 Page 169, lire nidulans et non nidulens.
 lire Cunninghamella et non Cunnuinghamella.
 lire cinerea et non cinneria.
 Page 169, lire nitrophyle et non nitophyle (3^e ligne en remontant).
 Page 173, au bas de la page, lire « par copulation à des résidus carbonés conduisant à des formes amino-acides ».

Erratum Bibliographique

- Page 12, lire Baudisch.
 Page 15, lire Stickstoffnahrung.
 Page 16, lire Entwicklung.
 Page 20, lire of azotobacter.
 Page 21, lire Fotpflanzung.
 Page 38, lire Permeabilität et Gewachsen.
 Page 39, lire Ammonium et Salze.
 Page 41, lire Frage et Nitrat.
 Page 49, lire Aciditat.
 Page 50, lire Pflanzenwurzten.
 Page 61, lire Robbins.
 Page 67, lire Ammonium et Nitrat.
 Page 71, lire Stickstoffwechselphysiologie et Studien.
 Page 72, lire Phytochimica.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA NUTRITION AZOTÉE DE LA CELLULE VIVANTE

ASSIMILATION DE LA MOLECULE NITRIQUE
PAR L'ASPERGILLUS REPENS *DE BARY*

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 1935

par

Jean DESBORDES

JURY... { MM. LUTZ, *Président*
BACH, *Professeur*
MASCRÉ, *Agrégé*

PARIS
LES PRESSES MODERNES
96, GALERIES BEAUJOLAIS

1935



A MON PÈRE

Le L^t-Colonel EDOUARD DESBORDES,
Officier de la Légion d'Honneur.

A MON ONCLE

ALBERT SALMON
Docteur en Pharmacie
ancien interne des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur

A MON MAITRE

Le Professeur DENIS BACH
Professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux de Paris,
Docteur ès-sciences

A MA FAMILLE, A MES AMIS

INTRODUCTION

Des travaux récents ont montré que les organismes végétaux (Plantes supérieures, Moisissures, etc...) étaient capables de réduire l'acide nitrique et de former de l'ammoniaque à ses dépens. On a même, dans certains cas, retrouvé cette ammoniaque dans le milieu extérieur.

M. D. BACH m'a proposé d'étudier le phénomène en utilisant diverses Moisissures (en particulier un champignon nitrophile, l'*Aspergillus Repens*, bien adapté à ce genre de recherches) et en employant la méthode de culture utilisée dans son laboratoire : la technique des voiles substitués.

Nous tenons ici à remercier M. le Professeur LUTZ d'avoir mis obligeamment son laboratoire à notre disposition et de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

M. le Professeur agrégé BACH, Pharmacien de l'Hôpital Tenon, nous a précisé le sujet de ce travail et nous a fourni les matériaux qui nous ont permis de le mener à bien. Nous sommes heureux de le remercier des conseils éclairés qu'il nous a si souvent prodigués et de l'intérêt qu'il nous a toujours porté. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre très sincère reconnaissance.

Tous nos remerciements vont également à M. le Professeur agrégé MASCRÉ, qui a bien voulu faire partie du jury et à qui nous exprimons nos respectueux hommages,

II

HISTORIQUE

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DES IDÉES

Nous nous sommes proposé d'étudier l'assimilation de l'ion nitrique par la cellule végétale.

L'hypothèse la plus couramment admise aujourd'hui est que l'acide nitrique est réduit en ammoniacque par la cellule elle-même.

**

Mais si on a montré, souvent et facilement, la présence d'ammoniacque dans une cellule à qui l'on avait offert de l'acide nitrique comme aliment azoté, cela ne suffit pas pour démontrer la réduction de NO^3H en NH^3 .

En effet cet ammoniacque peut provenir de beaucoup d'autres causes dont la principale est la protéolyse observée surtout dans les vieilles cultures, phénomène bien connu depuis les travaux de MALFITANO (36).

Seule doit être considérée comme démonstrative la caractérisation d'ammoniacque dans les cultures très jeunes et faites à l'abri de la protéolyse.

Mais on se heurte là à de nombreuses difficultés dont la principale réside dans le fait que l'ammoniacque est un terme

transitoire qui ne s'accumule pas normalement dans la cellule et qui est entraîné dans des réactions de synthèse dès son apparition.

*
**

On peut considérer comme début des travaux modernes sur cette question la publication de KOSTYTCHÉW et TSWETKOWA (26).

1° KOSTYTCHÉW et TSWETKOWA (1920) (26).

Tous deux admettent avec tout le monde, que les nitrates sont réduits en ammoniacque en ayant comme stade intermédiaire des nitrites.

Pour eux la démonstration peut s'effectuer en deux temps :

- a) Caractérisation des nitrites aux dépens des nitrates.
- b) Réduction des nitrites en ammoniacque.

Mais étant donné la toxicité des nitrites ils opèrent en milieu alcalin.

Les auteurs insistent sur le fait d'opérer très rapidement : l'ammoniacque disparaissant très vite et devenant impossible, dès lors, à caractériser nettement.

KOSTYTCHÉW et TSWETKOWA réussissent à mettre en évidence l'ammoniacque dans les premières heures de l'expérience.

Ils opèrent sur l'*Aspergillus niger* et le *Mucor racemosus*.

A la 2^e heure de culture ils caractérisent nettement NH^3 sans déceler la réaction de l'N/aminé.

A la 5^e heure, ils trouvent encore de l' HN^3 à côté de l'N/aminé.

A la 12^e heure, la réaction de NH^3 est déjà moins nette. On caractérise toujours N/aminé.

A la 24^e heure on ne trouve plus d'azote ammoniacal.

Enfin à la 48^e heure on ne trouve plus ni NH^3 ni N/aminé.

Les auteurs notent que la consommation des nitrites est complète en présence de sucre et presque incomplète en son absence.

2° WARBURG et NEGELEIN (76).

Ces auteurs ont abordé en 1920 également, le même problème en utilisant une algue verte : *Chlorella Pyrenoida* et des méthodes assez différentes.

Pour eux NH^3 est un produit transitoire qui, aussitôt formé, disparaît en étant entraîné dans des réactions de synthèse.

On n'aura donc des chances de la caractériser qu'en utilisant un artifice quelconque : soit en augmentant la production de cet ammoniac, soit en diminuant son utilisation, soit en employant ces deux moyens à la fois.

A) Action sur la production de l' NH^3

Or, dans le cas de l'assimilation des nitrates il semble que le protoplasme soit capable de réduire instantanément tout l'azote nitrique pénétrant dans la cellule. Le problème revient donc à augmenter artificiellement cet afflux d'ion nitrique.

Mais l'acide nitrique ne pénètre dans la cellule, et ces faits seront discutés plus loin, qu'à l'état moléculaire et vu la constante de dissociation de cet acide, une solution de nitrate ne renferme de proportions notables de molécules NO^3H que si l'on se trouve en milieu très acide.

C'est ce qui a conduit WARBURG et NEGELEIN à utiliser leur mélange :

NO^3K	1 partie
NO^3H	9 parties

En effet, dans ces conditions on constate que la cellule verte produit d'emblée aux dépens de NO^3H de très notables quantités de NH^3 qui passent dans le milieu extérieur.

Ces savants n'ont d'ailleurs pas étudié les conditions d'équilibre qui permettent l'extravasation de NH^3 .

Ce sera l'œuvre notamment de MEVIUS et de PRIANISCHNIKOW.

B) Action sur l'utilisation de NH^3

WARBURG et NEGELEIN ont cherché à diminuer la facilité pour la cellule d'utiliser l'ammoniac.

Pour ce faire, ils utilisent l'influence :

- a) de l'obscurité,
- b) des narcotiques,
- c) des cyanures.

Par ces moyens divers les auteurs arrivent ainsi à mettre artificiellement en évidence la formation directe d'ammoniaque à partir des nitrates.

3° KLEIN, EIGNER et MULLER (23).

En 1926, KLEIN, EIGNER et MULLER entreprennent de reprendre tous ces travaux, car, disent-ils, « tous les essais qui veulent nous expliquer les phénomènes vitaux doivent éviter les conditions pathologiques » et justement les travaux précédents n'ont pu se mettre à l'abri de telles conditions.

L'étude de KLEIN, EIGNER et MULLER commence par une sévère critique des résultats de KOSTYTCHÉW. Ils lui reprochent surtout d'avoir coupé en deux le phénomène, c'est-à-dire d'avoir montré dans un premier stade la formation « dans des conditions très particulières » de NO^2H , puis celle de NH^3 à partir de NO^2H dans une deuxième partie.

Enfin KLEIN, EIGNER et MULLER font remarquer que certains résultats qualitatifs sont entachés d'erreur de calcul ou de mesure car, dans certains tableaux, l'azote total retrouvé est supérieur à l'azote total fourni.

Ils utilisent l'*Aspergillus niger* et diverses Moisissures et constatent que les cultures avec des milieux ordinaires ne permettent pas de saisir le phénomène.

Ils sont donc amenés à se servir de milieux capables de modifier la marche de la réduction et finissent par adopter les milieux de WARBURG qui leur permettent de caractériser l'ammoniaque et divers amino-acides dans le milieu extérieur.

Par contre ni l'action de l'acide HCN , des narcotiques ou les cultures anaérobies ne leur permettent ces caractérisations.

KLEIN, EIGNER et MULLER font des cultures en milieu alcalin ce qui leur permet de mettre en évidence des amino-acides et des nitrites mais non de l'ammoniaque.

Finalement ces auteurs pensent que l'assimilation des nitrates par les champignons conduit, comme pour les plantes vertes, aux amino-acides en passant par les stades NO^2 et NH^3 .

Mais ils pensent que la réaction est exo-cellulaire et que la cellule n'effectue la synthèse azotée qu'avec des amino-acides issus de la réduction des nitrates et qui seuls traversent sa membrane.

Répondant à ces critiques KOSTYTCHÉW fera à son tour de nombreuses objections au travail de KLEIN (1927). Celui-ci lui répondra par la suite (22) (1928) mais cette controverse n'apporte aucun fait nouveau ni aucune expérience.

4° D. BACH, TAMIYA, SAKAMURA, RIPPEL.

Vers la même époque et indépendamment de ces travaux que je qualifierai de fondamentaux quant au sujet qui m'intéresse, différents savants ont abordé incidemment l'étude de l'assimilation de l'ion nitrique.

A) C'est ainsi que D. BACH (2), dans son travail initial de 1926, admet comme preuve de l'utilisation de l'ion NO^3 , en s'en tenant aux conclusions de KOSTYTCHÉW, que l'ammoniaque apparaît de bonne heure, mais disparaît non moins vite, puisqu'on ne peut plus la caractériser au bout de 24 heures. Il utilise l'*Aspergillus repens* en culture sur nitrate de K et nitrate d' NH^3 .

Avec le nitrate de potassium il observe une utilisation de l'ion nitrique, le maximum étant atteint vers $\text{pH} = 4$. Avec le nitrate d'ammoniaque il observe une consommation précoce de l'ion nitrique même en présence d'une grande quantité d'ammoniaque et il le contrôle par des dosages de l'azote disparu sous ses différentes formes : N/NH^3 et N/NO^3 .

B) TAMIYA (71 et 72) au cours d'un vaste ensemble de travaux s'attache à dégager l'influence de la réaction du milieu sur l'assimilation des anions et des cations, influence du reste étudiée, à la même époque de tous côtés et dans tous les domaines de la physiologie. En 1927, il étudie entre autres le comportement des ions NO^3 et NH^3 au cours des variations de la concentration en ions H du milieu de culture. Il opère avec l'*Aspergillus oryzae* (1927).

Mais ses travaux portent plus, en somme, sur l'assimilation des ions NH^3 et NO^3 que sur la réduction de l'ion NO^3 proprement dite.

C) SAKAMURA (67) qui étudie également les absorptions comparées de l'azote ammoniacale et de l'azote nitrique par l'*Aspergillus Oryzoe* est amené à examiner le cas de la réduction de l'ion NO^3 en NH^3 . Il admet le phénomène qui lui semble conforme aux hypothèses admises jusqu'à ce jour mais il note que la preuve expérimentale manque encore.

Il pense, suivant l'avis d'auteurs précédents que la réaction se passerait hors de la cellule, dans le milieu de culture et qu'elle pourrait dès lors être influencée par diverses réactions chimiques, notamment par l'action réductrice de certains sucres employés dans le bouillon de culture comme source d'hydrate de carbone.

D) RIPPEL.

En 1931, RIPPEL (55) émet une hypothèse toute personnelle sur l'assimilation des ions NO^3 et NH^4 . Nous y reviendrons un peu plus loin.

5°) TRAVAUX DE PRIANISCHNIKOW SUR L'EXCRÉTION DE NH^3 .

Mais on ne peut quitter cette question sans aborder les travaux de PRIANISCHNIKOW quoique ceux-ci soient relatifs aux végétaux supérieurs.

PRIANISCHNIKOW (46 à 51) a observé à plusieurs reprises l'excrétion d'ammoniaque par les racines des plantes en expérience et il a précisé quelques-unes des conditions qui président au phénomène.

Il résulte de ses plus récents travaux (PRIANISCHNIKOW et IVANOVA) (52 et 53) que cette « sortie » se produit dans les cas suivants :

1°) quand les plantes (pois, lupin) sont placées dans une solution fortement acide (pH 2 à 3).

2°) quand on utilise comme source d'N, un sel physiologi-

quement acide, ce qui entraîne une acidification du milieu (*cf.* cas précédent).

3°) en présence des anesthésiques,

4°) par l'inanition, ce qui amène la disparition des glucides (étiolement),

5°) quand il y a disproportion entre l'afflux d'azote (sous forme de NH^3 ou de NO^3) et l'apport des glucides.

Tous ces faits s'expliquent suivant PRIANISCHNIKOW par un mécanisme unique qu'il a longuement étudié.

a) Pour PRIANISCHNIKOW l' NH^3 qui est le point de départ de la synthèse protéique se comporte néanmoins comme un toxique pour la cellule végétale ;

b) celle-ci est capable de neutraliser l'ammoniaque soit par neutralisation au moyen d'acides organiques, soit par formation d'amides, la plus courante étant l'asparagine.

Mais les molécules hydro-carbonnées qui sont utilisées pour la « détoxication » de NH^3 proviennent en dernière analyse de la dégradation des glucides. Si ceux-ci manquent ou sont en quantité insuffisante (cas 4 et 5), la cellule ne peut éliminer NH^3 qui s'accumule dès lors dans la cellule et ne peut que se déverser dans le milieu extérieur.

Dans les cas 1 et 2 la forte acidité du milieu extérieur troublant le métabolisme de l'azote empêche la formation des amides et conduit à un même résultat (d'après MEVIUS).

«Les acides, disent MEVIUS et ENGEL, se comportent comme des anesthésiques suspendant toutes les réactions de synthèse et notamment la formation des amino-acides et de l'asparagine».

6° HYPOTHÈSES DE MEVIUS.

MEVIUS a eu le mérite de donner une explication physico-chimique du phénomène qui paraît général et s'applique à tous les cas connus (38 à 40).

L'ammoniaque présente dans la cellule (libre ou à l'état de sel d'origine exogène ou endogène), y prend un état de dissociation réglé par le pH cellulaire (suc cellulaire ou protoplasme).

D'après ce que nous savons le suc cellulaire a une réaction neutre ou légèrement acide. Dans un tel milieu une portion rela-

tivement élevée de NH^3 existe à l'état de NH^4OH , non ionisé, par suite du phénomène d'hydrolyse. Si le milieu extérieur est très acide, comme dans les deux premiers cas étudiés par PRIANISCHNIKOW la concentration de NH^3 à l'état moléculaire y est nulle. Comme la molécule NH^4OH (ou mieux NH^3) passe très vite à travers les pores de l'ultra filtre que constitue la membrane, l'équilibre entre le milieu extérieur et intérieur tendra à se rétablir par passage du NH^3 intérieur vers la solution.

Le mouvement de NH^4 dans ce sens s'observera même si la concentration globale en NH^3 (salifiée et libre) est la même des deux côtés. Il continuera tant que le produit $\text{NH}^4 \times \text{OH}$ est plus élevé dans la cellule qu'à l'extérieur.

CHAPITRE II

POSITION DE LA QUESTION A L'HEURE ACTUELLE

Comme il est généralement admis que le point de départ de la synthèse protéique dans les végétaux est l'ammoniaque ou un corps voisin, le fait que les nitrates peuvent également servir d'aliment azoté implique leur réduction préalable par la cellule vivante.

La série des problèmes qui va se poser au sujet de l'assimilation des nitrates peut se résumer comme suit :

1°) Par quel mécanisme le nitrate pénétrera-t-il dans la cellule ?

2°) Par quel mécanisme NO^3H , après sa pénétration dans la cellule, est-il réduit en NH^3 ?

3°) Quelle est la destinée de cette NH^3 ainsi formée ?

*
**

Mais discuter ces problèmes c'est discuter toute la nutrition azotée. Je me contenterai donc d'essayer de mettre en lumière quelques faits qui seront utiles pour la discussion de mes expériences.

*
**

I. - Mécanisme de la pénétration des Nitrates

Le phénomène du mécanisme de la pénétration des nitrates va être dominé par deux faits primordiaux :

- 1° a) Dissociation électrolytique des nitrates ;
 b) Dissociation hydrolytique des nitrates ;
- 2° Pénétration des éléments dissociés dans la cellule.

1°) DISSOCIATION DES NITRATES.

a) *Dissociation électrolytique.*

Les nitrates alcalins existent dans le milieu extérieur sous forme moléculaire et ionisée, les proportions respectives des deux constituants étant réglées par le pH du milieu et la constante de dissociation de l'acide nitrique qui est très faible. (Voir plus loin page 30).

Il en résulte que dans les milieux biologiques la grande majorité du nitrate est à l'état d'ions ($\text{pH} > 3$).

Si on calcule, du reste, les valeurs de la partie non ionisée pour différents pH on se rend facilement compte du phénomène, puisque la quantité non ionisée n'atteint pas trois dixièmes de milligrammes pour pH 5 pour une concentration N/10 en acide nitrique.

CONCENTRATION en NITRATES	pH	RESTE de DISSOCIATION	NITRATE à l'état non ionisé
milieu N/10	2	0,29	0, mmgr 18
en nitrate	3	0,03	0, 024
renfermant	4	0,0039	0, 00249
6 gr. 40 de	5	0,00039	0, 000249
NO ₃ H %	6	0,000039	0, 0000249

b) *Dissociation hydrolytique.*

Lorsqu'on utilise un nitrate d'une base forte comme NH₃ même dans des milieux neutres, la quantité de (NO₃H) moléculaire est plus importante qu'il ne paraît au premier abord d'après la dissociation électrolytique.

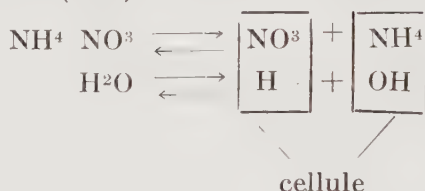
C'est qu'il faut faire intervenir le phénomène de dissociation hydrolytique.

Une solution de NH₄Cl, par exemple, renferme de l'ammoniaque à l'état libre. C'est là un fait connu depuis longtemps

et tous les biologistes savent, par exemple, qu'une telle solution stérilisée à l'autoclave, perd facilement une partie de cette ammoniacque très volatile, particulièrement lorsque la solution a une réaction plus ou moins alcaline (jusqu'à $\text{pH} = 6\text{-}7$ environ).

Dans le cas de nos nitrates la dissociation hydrolytique conduit à une augmentation de (NO^3H) moléculaire.

Finalement la dissociation électrolytique et hydrolytique peut être schématisée de la façon suivante que nous empruntons à T. SAKAMURA (1920) :



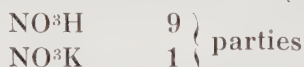
2°) PÉNÉTRATION DES ÉLÉMENTS DISSOCIÉS DANS LA CELLULE.

On peut considérer comme démontré le fait que les membranes des cellules végétales *intactes* sont peu ou pas perméables aux ions H et aux ions d'une façon générale (cations ou anions).

Elle n'est perméable qu'aux molécules non ionisées ce qui explique en particulier, qu'à concentration égale, les acides faibles peu ionisés sont plus antiseptiques que les acides forts.

Par suite une cellule absorbera d'autant plus vite et plus énergiquement l'acide nitrique que le milieu extérieur renferme plus de molécules NO^3H non ionisées, c'est-à-dire est *plus acide*.

Le mélange de nitrates de WARBURG (76)



correspond précisément à un mélange riche en (NO^3H) non ionisé.

*
**

Ces considérations expliquent du reste des faits d'expériences bien connus.

a) L'assimilation d'un nitrate produit une alcalinisation du milieu.

b) L'assimilation d'un sel d'ammoniaque produit une acidification.

c) Si l'on compare les vitesses d'absorption de NO^3H et de NH^3 (par exemple sous forme de NO^3NH^4) on observe qu'en règle très générale l'acide NO^3H est mieux absorbé du côté acide et la base NH^4OH du côté alcalin (vers $\text{pH} = 5$ l'assimilation des 2 corps azotés peut s'équilibrer).

En effet du côté acide, d'après ce que nous venons d'exposer, le milieu sera riche en molécules (NO^3H) facilement assimilables et du côté alcalin il sera riche en molécules (NH^4OH).

(Parmi un très grand nombre de références, citons TAMIYA, SAKAMURA, D. BACH, MEVIUS, etc...).

d) La toxicité si facilement mise en évidence de NH^4OH s'explique nettement :

On conçoit la pénétration très rapide de NH^4OH par rapport aux autres bases facilement mises en évidence par l'action intracellulaire : virage d'indicateurs, précipitation, changement de pH intracellulaire, etc...

La toxicité des sels ammoniacaux est surtout nette aux $\text{pH} > 7$ ou $\text{pH} 8$.

II. — Mécanisme de l'utilisation de NO^3 par la cellule

La destinée de NO^3H dans la cellule a suggéré de nombreuses hypothèses. Nous avons déjà dit qu'à l'heure actuelle on pensait, en général, que l'ion NO^3 était réduit en NH^3 .

Mais d'autres corps ont été étudiés à ce point de vue.

C'est ainsi que l'on a pensé (BANDISCH et MAYER) (12), que la réduction pouvait être un processus photo-chimique qui ne conduit pas à NH^3 . Les nitrates seraient tout d'abord réduits en nitrites, lesquels seraient portés au stade nitrosyl. Ce corps nouveau s'unissant à la formaldéhyde issue de l'assimilation du carbone donnerait finalement naissance à l'acide formhydroxamique, qui serait ainsi le dernier terme de la réduction.

On admet aussi (BRENNER) (15) que la réduction de l'ion

nitrique par les organismes inférieurs passent par les stades NO^3 — NO^2 — NH^2OH .

On a pensé également à une réaction directe de l'ammoniaque sur H.CHOH conduisant à la formiamide (ZOEW) ou même à un passage direct de NO^3H à ce corps :



(A. GAUTIER, PFLUGER) ce qui fait attribuer à HCN un rôle fondamental.

On a du reste voulu voir dans l'acide cyanique le générateur des substances protéiques et rattacher cette conception à la formation des protéines à partir de HCN . On a pensé voir une confirmation de cette théorie dans le fait que chez les plantes à HCN l'acide cyanhydrique diminue à mesure que les albumines se forment.

Quoi qu'il en soit, c'est la théorie de la filiation NO^3 — NH^3 qui paraît la plus plausible.

1°) — PREUVE DE LA RÉDUCTION DE NO^3H EN NH^3

a) On peut penser trouver dans cette preuve en caractérisant NH^3 dans la cellule. Mais on se heurte à des difficultés expérimentales telles que les rares recherches effectuées dans ce but (KLEIN) sont restées généralement négatives.

b) On a essayé avec plus de succès de mettre en évidence l'existence de NH^3 dans le milieu externe.

Disons tout de suite que l'on rejette tous les résultats obtenus sur des cultures âgées et ayant subi une protéolyse plus ou moins avancée (MALFITANO) (36) ; seuls sont donc retenus les résultats obtenus avec des cultures très jeunes et autant que possible encore riches en sucre.

Sur ces bases on ne connaît guère que les observations de :

I. *Moisissures* : KOSTYTCHEW et TSWETKOWA (26) — KLEIN, EIGNER et MULLER (23) — D. BACH et J. DESBORDES (10 et 11).

II. *Algues* : WARBURG et NEGELEIN (76).

III. *Végétaux supérieurs* : Ecole de PRIANISCHNIKOW (46 à 53) — MEVIUS et ses élèves (38 à 41).

Mais pourquoi peut-on retrouver hors de la cellule NH^3

issue de la réduction des nitrates par le protoplasme de la cellule ? C'est ce que nous examinerons tout à l'heure.

Voyons, pour l'instant, quel est le mécanisme de la réduction.

2°) — MÉCANISME DE LA RÉDUCTION

a) *Réduction couplée avec oxydation du glucose.* — WARBURG et NEGELEIN (76) estiment que la réduction est normalement couplée avec l'oxydation complète de la substance énergétique.

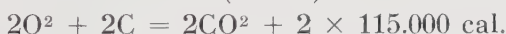
L'application des formules thermodynamiques montre que dans les conditions opératoires, la réduction de NO^3H exige 68.000 calories qui peuvent être fournies par l'oxydation respiratoire. En fait, dans la cellule cette énergie n'est pas fournie par l'acte respiratoire mais par un processus couplé de réduction où l'oxygène de NO^3H et l'oxygène de H^2O se combinent aux C des chaînes carbonées pour donner CO^2 .

Si on établit les changements d'énergie libre intervenant dans ces deux processus couplés, on aboutit à ces deux formules :

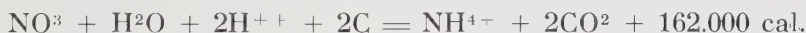
A) — Formation d'oxygène, réduction de NO^3 :



B) — Action de O sur C (sucres) :



soit en additionnant membre à membre :



Or WARBURG a déterminé dans ses expériences que la réduction des nitrates s'accompagnait d'une libération de 160.000 cal. travail.

2°) *Stade intermédiaire.*

Il est probable que la réduction suit la filiation :



(KOSTYTCHÉW, puis KLEIN, EIGNER et MULLER).

3°) *Lieu de la réduction.*

La réduction peut être :

a) endo-cellulaire,

b) exo-cellulaire.

Il est du reste vraisemblable que la première hypothèse corresponde à la réalité et la plupart des auteurs y sont favorables.

Cependant un certain nombre et en particulier KLEIN, EIGNER et MULLER, pensent que la réduction se fait dans le milieu extérieur.

Il est probable que la réaction est due à un ferment spécifique et l'on peut rattacher le phénomène à celui plus général d'oxydo-réduction : NO^3 jouant le rôle d'accepteur d'hydrogène et les glucides, dont WARBURG a montré le rôle, jouant celui de donateur d'hydrogène.

4°) *Hypothèse de RIPPEL sur l'utilisation de NH^3 par la cellule.*

Mais l'hypothèse du P. I. E. et sa mise en évidence (1) amenèrent un grand nombre de savants à voir en ce point (?) un

(1) *Point-iso-électrique* : on sait qu'un corps dit ampholyte est susceptible de posséder à la fois des fonctions acides et des fonctions basiques. Ces corps se ramènent tous à un schéma général $\text{HO} - \text{R} - \text{H}$ dans lequel la molécule est capable de libérer un ion H^+ et un ion OH^- . Les propriétés acides et basiques de la molécule dépendent uniquement de la réaction du milieu. Ainsi dans un milieu très acide l'ampholyte se comporte à la manière d'une base libre ; en effet dans un tel milieu la forte concentration de ions H^+ extérieur va arrêter la dissociation de la fonction acide tandis que la fonction alcaline sera au contraire libérée au maximum par suite de l'absence d'ions OH^- dans le milieu. Au contraire en milieu alcalin l'ampholyte se comporte comme un acide libre. Il s'ensuit que pour une certaine valeur de la réaction intermédiaire entre ces deux cas extrêmes l'ampholyte doit avoir ses deux valences également dissociées : à ce moment il est *électriquement neutre*.

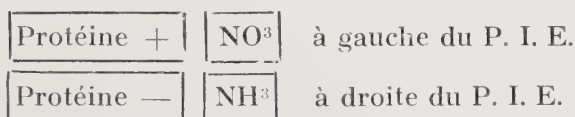
De telles propriétés se traduisent facilement par l'électrolyse. En effet si on fait passer un courant continu à travers une solution de ce corps amphotère, son radical se transportera, en milieu acide au pôle négatif, et en milieu alcalin au pôle positif. Mais au stade intermédiaire où ses deux valeurs s'équilibrent, il restera inerte sans être transporté. Ce point de transport électrique nul est dit P. I. E. et est caractérisé par la valeur qu'y présente la réaction du milieu (pHi).

(2) LOEB (34) semble avoir été le premier à insister sur l'existence d'un P. I. E. chez les protéines et à montrer les curieuses variations de propriétés physiques que présentent à ce niveau ces corps colloïdaux. C'est ainsi que la gelatine, par exemple, présente en ce point un minimum de gonflement, de pression osmotique, de solubilité, de conductibilité, de viscosité etc...

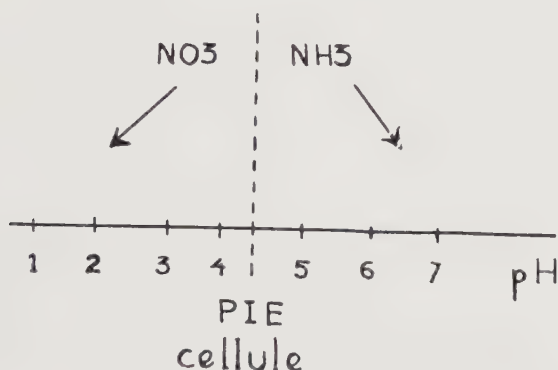
ROBBINS (60 à 63) admet que les tissus vivants possèdent un point iso-électrique propre en s'appuyant sur tout un ensemble d'expériences (absorption d'eau et gonflement, modification de la réaction du milieu extérieur, conductibilité électrique des tissus, adsorption et fixation de colorants). Il réalise même l'expérience suivante : il plonge des tranches de pomme de terre dans des solutions-tampons à pH variés et observe que les solutions les plus acides sont alcalinisées et les plus alcalines acidifiées. Les solutions tendant à prendre un pH caractéristique pour la pomme de terre. D'après Robbins ces variations de pH en sens inverse sont dues à la protéine du tissu qui se comporte comme un acide du côté alcalin, comme une base du côté acide, amenant ainsi les solutions tampons vers le pH caractéristique de la protéine : le pHi . L'existence d'un tel P. I. E. étant démontrée les autres faits observés : minimum de gonflement, fixation de colorant, etc., se rattacheraient à la même cause.

renversement des propriétés biologiques des corps capable d'expliquer bien des phénomènes. C'est ainsi que RIPPEL (55), appliquant l'effet ROBBINS dans son sens le plus large, pense que le protoplasme des cellules se comporte comme un véritable ampholyte, se combinant à droite de son P. I. E. avec les corps alcalins et à gauche avec les corps à réaction acide.

Ce qui revient, en somme, à considérer l'absorption de l'ammoniaque ou celle de l'acide nitrique comme une véritable combinaison chimique entre les protéines du protoplasme et le corps azoté :



Nous empruntons, du reste, à RIPPEL, le schéma suivant qui résume bien sa théorie :



III. — Destinée de l'Ammoniaque issue de la réduction.

1°) POSITION DU PROBLÈME.

Voyons maintenant ce que peut devenir l'ammoniaque ainsi formée. Ce corps produit dans la cellule est (MEVIUS) :

- 1° très réactionnel ;
- 2° très toxique ;
- 3° très diffusible à travers la membrane cellulaire.

Or on peut considérer comme démontrés les points suivants :

a) Tout NO^3H qui arrive dans la cellule dans des conditions convenables est instantanément réduit (ceci résulte directement de la théorie de MEVIUS et des faits acquis par WARBURG).

b) NH^4OH ainsi formé (ainsi, du reste, que tout NH^4OH qui peut se trouver dans la cellule par suite de : protéolyse, germination, assimilation quelconque) est très toxique et tue la cellule par changement du pH.

c) Mais la cellule dispose de plusieurs mécanismes pour lutter contre cet envahissement toxique.¹

I. Elle peut se débarrasser de NH^4OH par copulation avec un acide pour former des sels ammoniacaux (PRIANISCHNIKOFF).

II. Par copulation avec des résidus carbonés à forme amino-acide et des protides (cas probable des Moisissures d'après D. BACH).

III. Enfin par l'exosmose de NH^4OH .

Les 2 premiers processus envisagés nécessitent la présence de sucre et de leurs produits de dégradation.

Le dernier cas se produit facilement en milieu acide.

2°) MÉCANISME DE L'EXOSMOSE DE NH^3

L'ammoniaque issue de la réduction endo-cellulaire de l'acide nitrique prend immédiatement l'état de dissociation réglé par le pH du contenu cellulaire (généralement compris entre 5,5 et 7). Une certaine partie de l'ammoniaque prend donc la forme non ionisée (NH^4OH) pour laquelle l'ultra-filtre constitué par la membrane cellulaire est très perméable.

Il nous faut maintenant considérer la réaction du milieu extérieur. Trois cas peuvent se présenter :

a) milieu acide,

b) milieu neutre,

c) milieu alcalin.

En tenant compte de la dissociation hydrolytique des sels ammoniacaux on peut tenir le raisonnement suivant (MEVIUS) :

Si le milieu extérieur est très acide, l'ammoniaque qui y arrive s'y ionise intégralement si bien que l'ammoniaque à l'état

moléculaire ne peut jamais y atteindre une tension comparable à celle qui existe dans la cellule si faible soit-elle.

De la sorte, en vertu de la loi du déplacement de l'équilibre, toute l'ammoniaque produite dans la cellule peut être déversée dans le milieu extérieur au fur et à mesure de sa formation.

Dans les autres cas (milieu neutre ou alcalin), on peut prévoir, en appliquant ce raisonnement, que l' NH^3 endogène reste à la disposition de la cellule.

C'est justement le point que nous nous sommes proposé d'étudier dans ce travail.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA DISSOCIATION DE L'ACIDE NITRIQUE ET DE L'AMMONIAQUE

Calcul du degré de dissociation α et du reste de dissociation Q de NO_3H et de NH_3

Il nous faut maintenant calculer les quantités d'acide nitrique et d'ammoniaque qui vont se trouver à l'état ionisé ou non dans le milieu de culture, selon sa réaction de ce dernier.

On trouvera du reste la plus grande partie des détails sur cette question dans l'ouvrage de MICHAELIS « *Wasserstoffionen-konzentration* » (Springer, Berlin, 1914) (42).

Mais on ne trouve que fort peu d'indications sur ce sujet dans la littérature de langue française, aussi avons-nous réuni dans ce chapitre le raisonnement et les calculs qui nous ont permis d'établir le degré et le reste de dissociation de NO_3H et de NH_3 .

La plus grande partie de ce raisonnement a été, du reste, empruntée à la publication de D. BACH dans le B. S. P. (6) qui expose la dissociation de l'acide lactique.

Nous avons déjà dit que RIPPEL expliquait l'absorption de l'ion nitrique en estimant que le mycelium, véritable colloïde amphotère, placé en milieu acide se comportait comme une base en absorbant l'ion NO_3 pour donner une molécule complexe :



MEVIUS pense plus simplement que, seule, la molécule électriquement neutre est susceptible d'entrer dans la cellule.

La conception de RIPPEL présente le grave inconvénient de considérer le PH du protoplasme comme étant sujet à des varia-

tions, ce qui ne paraît pas conforme à ce que l'on sait des concentrations en ions H du milieu intra-cellulaire.

Nous préférons admettre, comme MEVIUS, l'entrée des nitrates dans la cellule sous forme moléculaire. L'ion NO^3 est alors réduit par les catalyseurs intra-cellulaires et l'ammoniaque formée prend l'état de dissociation toujours réglée par le pH intérieur.

L'ammoniaque se trouve pour la plus grande part à l'état ionisé c'est-à-dire à l'état d'ions NH^4 et OH. Une autre partie, faible mais réelle, y prend la forme moléculaire NH^4OH , or sous cette forme l'ammoniaque tend à traverser la membrane.

L'étude de la dissociation de ces corps nous est donc nécessaire.



Depuis les travaux de SORENSEN et de MICHAELIS, il est devenu commode de mesurer et d'exprimer dans un milieu non seulement la concentration en ions H fournis par la dissociation d'un acide, mais aussi celle des anions et du reste de la molécule non ionisée.

Considérons notre nitrate NO^3K .

Rappelons que l'on appelle « degré de dissociation » d'un électrolyte, le rapport entre les molécules dissociées en ions et le total des molécules introduites dans la solution. Ce degré de dissociation est, en somme, le pourcentage de molécules dissociées dans le total ; soit, dans le cas présent :

$$\alpha = \frac{(\text{NO}^3)}{\text{NO}^3\text{H}}$$

« Le reste de dissociation » q est égal au rapport de l'acide non dissocié à la masse totale de l'acide, quelque soit sa forme :

$$q = \frac{(\text{NO}^3\text{H}) - (\text{NO}^3)}{(\text{NO}^3\text{H})}$$

D'autre part, l'application de la loi d'action de masse au calcul de la dissociation de l'acide nitrique donne la relation suivante :

$$K = \frac{(h) \cdot (NO^3)}{(NO^3H)}$$

où K représente la constante de dissociation de l'acide nitrique et NO^3H la masse d'acide nitrique non dissociée en ions h et NO^3 . Cette équation peut s'écrire :

$$NO^3H = \frac{(h) \cdot (NO^3)}{k}$$

Comme d'autre part, la masse totale de l'acide nitrique sous ses différentes formes représente la somme de l'acide non ionisé (NO^3H) et de l'acide à l'état d'ions nitrates (NO^3), la première relation peut s'écrire :

$$\alpha = \frac{(NO^3)}{(NO^3) + (NO^3H)}$$

qui devient, en remplaçant (NO^3H) par sa valeur exprimée plus haut :

$$\alpha = \frac{(NO^3)}{(NO^3) + \frac{h \times (NO^3)}{k}} = \frac{1}{1 + \frac{h}{k}}$$

Cette équation permet donc de calculer la valeur de α en fonction d'une grandeur véritable, mais mesurable expérimentalement (pH) et d'une valeur constante k, constante de dissociation de l'acide. Cette dernière valeur apparaît comme le paramètre de cette fonction.

On a naturellement pensé à représenter graphiquement ces variations mais la représentation graphique obtenue en mettant α en ordonnées et h en abscisse aboutit à une courbe peu démonstrative.

Mais si l'on utilise la notation de SORENSEN en transformant les abscisses de façon logarithmique (pH) on obtient une courbe

$$\text{en S. L'égalité précédente s'écrit alors : } \alpha = \frac{k}{k + 10^{\text{pH}}} \quad (1).$$

La courbe se fait en plaçant α en ordonnée et pH en abscisse. Cette courbe présente en son milieu un point d'inflexion correspondant à l'ordonnée 0,5. L'abscisse correspondante à ce point représente le log. de l'inverse de la constante de dissociation pris négativement. Ce sont les coordonnées correspondant au point de demi-saturation de l'acide.

L'emploi de ces formules et de leurs représentations graphiques permet de calculer pour un milieu de pH déterminé le pourcentage de l'acide ionisé et moléculaire. Connaissant la concentration globale de l'acide, on en déduit celle de ces divers constituants. En particulier, la concentration de la molécule non ionisée C_m sera donnée par la formule ci-dessous où C égale la concentration totale de l'acide sous ses différentes formes.

$$C_m = \frac{C \times q}{100} \quad (2)$$

Construction des courbes de dissociation des Acides et des Bases

Nous venons de voir que le degré de dissociation α d'un acide par exemple, s'exprime en fonction de la constante de dissociation ka et du pH de la solution par la relation déjà indiquée plus haut.

$$\alpha = \frac{1}{1 + \frac{h}{k}}$$

La construction des courbes de dissociation nécessite de connaître la valeur de h (ou pH) quand on fait varier α de 0 à l'unité.

L'expression ci-dessus peut s'écrire successivement :

$$\alpha \left(1 + \frac{h}{k} \right) = 1 \quad \text{ou} \quad h = k \left(\frac{1 - \alpha}{\alpha} \right)$$

Dans cette relation k est une quantité fixe pour chaque acide ou chaque base. Le facteur $1 - \alpha$ peut être calculé à l'avance

α

une fois pour toutes pour toutes valeurs de α .

On obtient ainsi la valeur de h que l'on transforme facilement en pH (1).

On peut obtenir directement le pH en remarquant que :

$$\text{pH} = \log. \frac{1}{h} \text{ et en écrivant :}$$

$$\text{pH} = \log. \frac{1}{h} = \log. \frac{1}{k} + \log. \left(\frac{\alpha}{1 - \alpha} \right)$$

Dans cette expression $\log. \frac{1}{k}$ est connu et on peut facile-

ment calculer $\log. \frac{\alpha}{1 - \alpha}$ sachant que $\alpha = \frac{k}{h + k}$ d'après ce que nous avons précédemment établi.

Calcul de la courbe de dissociation de NH_3

Il nous est donc facile, d'après ce que nous venons d'exposer de calculer les valeurs nécessaires pour la construction de la courbe de dissociation de l'ammoniaque. (Courbe 1).

NH_3 a comme constante de dissociation : k_B :

D'après VLES (p. 101) (75) 1.75×10^{-5}

— KOPACZEWSKI (p. 285) (27) 2.30×10^{-5}

— LEGENDRE (p. 27) (32) 1.10×10^{-5}

1

En adoptant 1.75×10^{-5} on obtient pour $\log. \frac{1}{k_B}$ la valeur

suivante :

(1) Pour cette transformation on a recours à un tableau que l'on établit d'après la relation $\text{pH} = \frac{1}{H} \log. = \text{colog. } H$. On calcule d'abord l'inverse du pH en retranchant de 100 la fraction décimale de pH. Ainsi pH 8,75 donne 25 et l'on cherche dans les tables de log. à quel nombre entier correspond la valeur logarithmique 25.

$$\begin{aligned}\log. kb &= \log. 1,75 = 0,243 \\ &= \log. 10,5 = 5\end{aligned}$$

$$5,243$$

soit :

$$\text{colog. } \frac{1}{kb} = 4,757$$

Pour obtenir le chiffre en valeur de pH, comme nous avons affaire à une base, il faut retrancher à ce chiffre la valeur 14,14, ce qui donne :

$$14,14 - 4,76 = 9,38$$

Le point de demi-virage de NH^3 est donc à pH de 9,38.

La courbe de dissociation se construit facilement ainsi que nous venons de l'exposer en ajoutant à ce chiffre les valeurs de

$$\text{colog. } \frac{1 - \alpha}{\alpha}$$

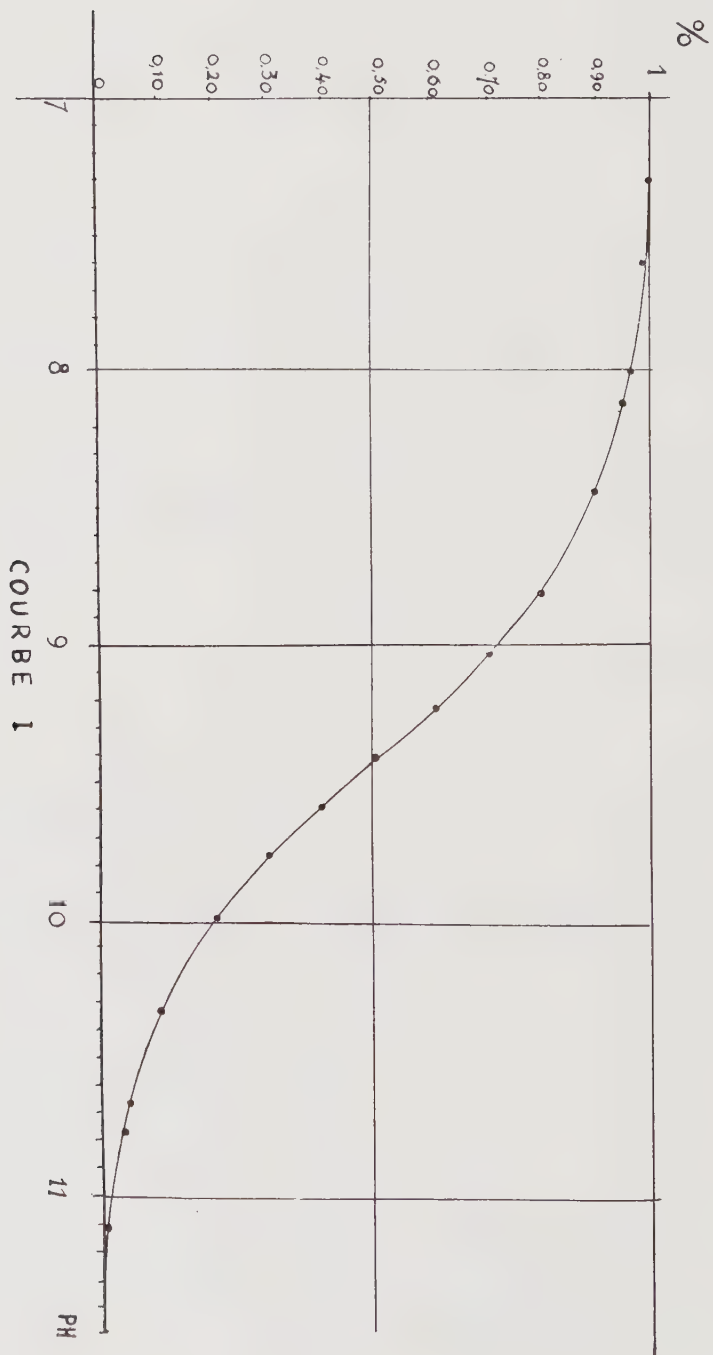
pour les diverses valeurs de α .

$$\text{En somme on a : } \text{pH} = \text{pkb} - \log. \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

Dans le tableau suivant nous avons relevé ces diverses valeurs.

α	$\text{colog. } \frac{1 - \alpha}{\alpha}$	pH	α	$\log. \frac{1 - \alpha}{\alpha}$	pH
0.99	1.99	7.39	0.40	0.177	9.56
0.98	1.69	7.68	0.30	0.369	9.75
0.97	1.51	7.87	0.20	0.602	9.98
0.96	1.38	8.	0.10	0.955	10.33
0.95	1.28	8.10	0.05	1.28	10.66
0.90	0.95	8.43	0.04	1.38	10.76
0.80	0.602	8.78	0.03	1.51	10.89
0.70	0.367	9.01	0.02	1.69	11.07
0.60	0.176	9.20	0.01	1.99	11.37
0.50	0	9.38			

COURBE DE DISSOCIATION DE L'AMMONIAQUE



Calcul de la courbe de dissociation de NO^3H

Ainsi que nous venons de le faire pour l'ammoniaque, il va nous être facile de représenter graphiquement la dissociation de l'acide nitrique. (Courbe 2).

NO^3H a une constante de dissociation de « l'ordre de l'unité, mal définie » (VLES, p. 111) (75).

M. D. BACH m'a indiqué, sous toutes réserves, le chiffre de :

$$k = 0,25 \times 10^{-1}$$

chiffre que j'adopte pour mes calculs.

On obtient pour $\log. \frac{1}{k}$ les valeurs suivantes :

$$\log. \frac{1}{k} = \text{colog. } 0,25 + \text{colog. } 10^5$$

soit : $\log. k = \text{colog. } 0,25 = 1,398$

$$\log. 10^{-1} = 1$$

$$\frac{\text{soit : } \text{colog. } \frac{k}{1} = 1,602}{2,398}$$

Le point de demi-virage de NO^3H est donc à $\text{pH} = 1.60$.

La courbe de dissociation se construit facilement ainsi que nous venons de l'exposer précédemment. On ajoute à ce dernier chiffre la valeur de :

$$\text{colog. } \frac{1 - \alpha}{\alpha}$$

pour les diverses valeurs de α .

Ce qui donne :

$$\text{pH} = \text{pka} - \log. \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

Le tableau suivant donne les valeurs pH en fonction de α .

α	colog. $\frac{1-\alpha}{\alpha}$	pH	α	colog. $\frac{1-\alpha}{\alpha}$	pH
0.01	1.99	0	0.70	0.17	1.77
0.02	1.69	0	0.80	0.36	1.96
0.03	1.51	0.09	0.90	0.602	2.20
0.04	1.38	0.22	0.95	0.955	2.55
0.05	1.28	0.32	0.96	1.28	2.88
0.10	0.95	0.65	0.97	1.38	2.98
0.20	0.60	1.	0.98	1.51	3.11
0.30	0.36	1.24			3.29
0.40	0.17	1.43	0.99	1.69	3.59
0.50	0	1.60			

Il est donc facile, à l'aide de ces courbes, de connaître pour des valeurs diverses les restes de dissociations de ces corps suivant leur concentration.

Prenons, par exemple, le cas de l'acide NO^3H que nous avons employé à la concentration N/10 dans nos expériences.

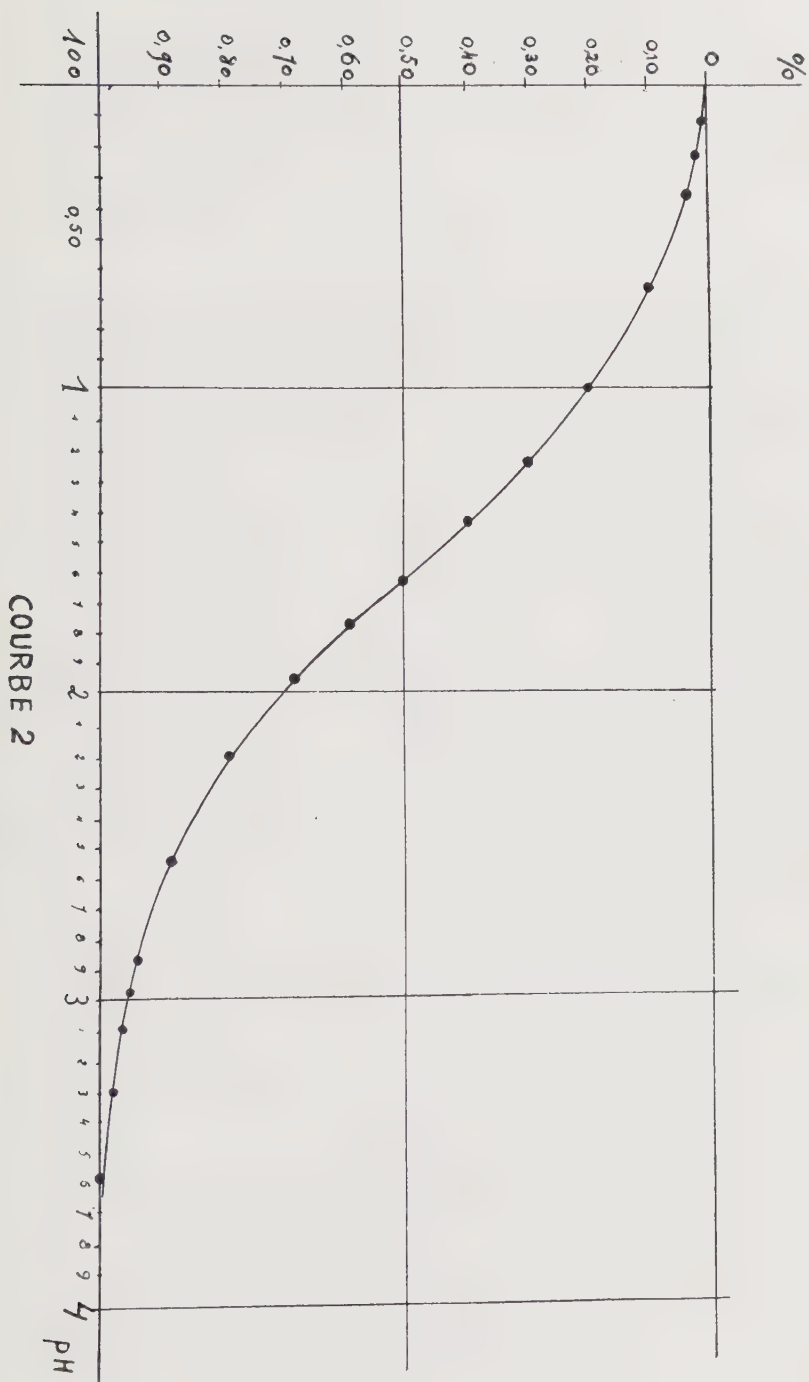
A l'aide de l'ensemble des données précédentes on peut dresser le tableau suivant sachant que $\text{NO}^3\text{H} = 64$ et en rappelant l'équation : $C = q \times 6,40$

(C = concentration de la molécule non ionisée).

(q = reste de dissociation).

pH	α	$q = 1 - \alpha$	Cm
0	1	0	0
1	0.20	0.80	0.51
2	0.71	0.29	0.18
3	0.961	0.039	0.0249
4	0.0961	0.0039	0.00249
5	0.00961	0.00039	0.000249
6	0.000961	0.000039	0.0000249
7	0.0000961	0.0000039	0.00000249

COURBE DE DISSOCIATION DE L'ACIDE NITRIQUE



COURBE 2

Nous voyons en particulier que les valeurs pH et α retrouvées dans les calculs de ce tableau correspondent exactement à celles que l'on peut trouver en examinant la courbe ci-contre (NO^3H).

*
**

On voit donc que dans nos milieux utilisés N/10 en NO^3K (renfermant 6 gr. 40 de NO^3H 0/00) la concentration du reste de dissociation, c'est-à-dire de l'acide existant à l'état moléculaire, donc apte d'après la théorie de MEVIUS à pénétrer dans la cellule, est de 2 centigr. 0/00 environ à pH3 ; 2 mmgrs à pH4, pour n'être plus que deux 1/10 de milligramme environ à pH5.

Il est vrai que cette concentration est maintenue constante quand une partie de la molécule a pénétré dans la cellule par création d'un nouvel équilibre à partir de NO^3H dissocié.

Cette manière de voir, dont nous empruntons le raisonnement à MEVIUS, explique donc que la valeur alimentaire de NO^3H est d'autant plus grande que le milieu est plus acide.

Un raisonnement identique peut être fait pour NH^3 et nous permet d'aboutir à des conclusions semblables.

Mais dans ce cas la valeur alimentaire de NH^3 est d'autant plus grande que le milieu est plus alcalin.

III

LES MÉTHODES D'ÉTUDES

CHAPITRE PREMIER

LES CONDITIONS DE CULTURE

Nous avons mis en œuvre deux méthodes de culture différentes :

1°) *Culture ordinaire* à partir de spores, qui ne peut guère donner de renseignement que sur l'aptitude d'un organisme à utiliser ou non l'acide nitrique.

2°) *Culture sous voile solide préformé* avec laquelle on peut aborder l'étude méthodique de la réduction de l'acide nitrique.

1. — Les organismes utilisés

Plus de 25 moisissures différentes ont été examinées. L'espèce la plus souvent utilisée fut l'*Aspergillus repens* de BARY. Elles provenaient toutes de la mycothèque de la Faculté de Pharmacie de Paris.

1° — PHYCOMYCÈTES.

Mucorinées : *Mucor circinelloïdes*.

- » *corymbifer*.
- » *Boulardii*.
- » *Guillermondii*.
- » *Prainii*.
- » *racemosus*.
- » *spinosus*.

Rhizopus nigricans.
» reflexus.
Absidia racemosus.
» dubia.
Cunninghamella echinulata.
Circinella spinosa.
Glomerula repens.

2° — ASCOMYCÈTES.

Perisporiacées : Aspergillus niger.
» nidulans.
» repens.
Sterigmatocystis butyracea.
Penicilium clavatum.
» glaucum.
Botrytis cinerea.
Protoascinéés : Levures. Torula rouge.

3° — HYPHOMYCÈTES.

Fusarium roseum.
Alternaria solani.
Dematium pullulans.

2. — Les milieux de culture

Nous avons employé un milieu de culture liquide couramment utilisé au laboratoire de M. D. BACH. La formule de ce milieu est établie de manière à obtenir des solutions à titre simple normalisées :

Constante minérale 5 %
Sel azoté (nitrate) N/10

soit nitrate de potassium,
soit nitrate d'ammoniaque

Glucose 5 %
Citrates de soude 2 %
Chlorure de sodium 2 %
Eau bidistillée Q.S.

La constante minérale est celle utilisée au laboratoire depuis longtemps par M. BACH :

Phosphate monopotassique	37 g. 20
Chlorure de potassium	15 g. 10
Sulfate de Magnésie	9 g. 84
Perchlorure de fer	2 gouttes
Sulfate de zinc	0,20
Eau bidistillée	1.000

Les sels utilisés sont des produits purs qui ont été recristallisés deux fois au laboratoire dans l'eau bidistillée.

La substance azotée est l'élément variable. Nous avons utilisé : soit le nitrate de potasse, soit le nitrate d'ammoniaque. Les deux corps ont été recristallisés plusieurs fois au laboratoire dans l'eau bidistillée. Ils ont été dissous à une concentration telle que le milieu était toujours N/10 en azote. Nous avons utilisé quelquefois le chlorydrate d'ammoniaque et le succinate d'ammoniaque dans les mêmes conditions.

La source d'hydrate de carbone est constituée par du glucose pur.

Le milieu ainsi constitué pourrait très bien convenir à la culture de nos Moisissures ; mais, afin de ne pas avoir de trop grandes variations de pH pendant la durée de l'expérience, il fallait y ajouter un sel à pouvoir tampon. Nous avons utilisé le citrate de soude, car l'acide citrique, par ses trois fonctions acides produit un effet tampon sur une zone très étendue. Ce citrate provenait d'un « sel pur pour analyse » recristallisé en présence d'alcool.

Divers travaux que nous rappellerons ultérieurement (voir p. 128) ont montré que l'*Aspergillus repens* ne pousse bien que sur les milieux dont la pression osmotique est élevée. On a réalisé ici cette condition en additionnant systématiquement nos milieux de NaCl.

Lorsqu'au cours de certaines expériences nous nous sommes servis de milieux de formules différentes de ceux-ci, nous en avons donné la formule.

La concentration en ions H des milieux a été déterminée par la méthode à la quinydrone suivant la technique que nous exposerons plus loin.

Les milieux sont alors ajustés à des pH différents en suivant la méthode utilisée au laboratoire.

Préparation des milieux

Suivant la technique de culture utilisée nous avons opéré un peu différemment.

Dans la méthode de culture directe nous préparons une solution à concentration double dite « solution mère » que nous ajustons à un certain pH en ajoutant soit un acide soit une base. Enfin le volume est complété avec de l'eau distillée.

Les milieux ainsi préparés sont répartis en fioles d'ERLEN-MEYER de 125 cc. à raison de 25 cc³ par fioles. Après bouchage et capsulage les fioles sont stérilisées à 115° pendant 10 minutes.

Généralement la stérilisation par la chaleur modifie peu ou pas la réaction des liquides. Nous avons, cependant, observé un changement dans la teneur en azote ammoniacal des solutions de sels ammoniacaux (1).

Cette variation s'explique par le fait que, dans un milieu neutre ou alcalin et même faiblement acide, l'ammoniaque est en partie, à l'état de molécules NH_3 volatiles.

C'est ainsi que nous avons surtout remarqué ce fait dans le cas de milieux neutres ou alcalins à base de nitrate d'ammoniaque.

Le titre d'azote nitrique restait constant dans ces mêmes conditions.

On sait, en outre, que les milieux se colorent à l'autoclave. Dans les solutions neutres ou alcalines le liquide passe au jaune foncé puis au brun, les teintes étant d'autant plus prononcées que le pH du milieu est plus élevé. Dans les zones acides on n'observe rien de semblable.

Des variations analogues, après stérilisation, ont été remarquées déjà par CESBRON (1929) (17).

Dans notre méthode dite « des voiles solides », les milieux de culture étaient stérilisés en bloc, soit dans des ampoules scellées, soit dans des ballons de 500 cc. bouchés au coton cardé et

(1) Pour obvier à cet inconvénient nous avons quelquefois stérilisé nos milieux en tubes scellés.

capsulés. La répartition dans les différentes fioles se faisait par le dispositif de BACH, adapté à la méthode des voiles solides, permettant avec le même appareil de mesurer et de répartir aseptiquement les milieux stériles.

Les dosages ont toujours été pratiqués sur des témoins prélevés sur des fioles passées préalablement à l'autoclave.

3. — Les conditions de culture

Nous ensemençons simultanément une série de fioles qui sont retirées successivement de l'étuve à heures fixes.

Il faut s'attacher à réaliser les conditions de culture aussi identiques que possible entre tous les vases, afin que l'on puisse considérer les résultats obtenus comme les stades successifs d'une même culture. Les vases utilisés sont en verre Pyrex, tous de même forme.

Nous utilisons dans notre étude deux méthodes de culture : la méthode de culture directe, méthode classique et la méthode dite « des voiles solides » ou des « voiles préformés » que nous étudierons spécialement dans le chapitre suivant.

Dans la méthode de culture directe, on part de milieux répartis à raison de 25 cc³ dans les fioles et stérilisés ainsi qu'il a été dit précédemment. La répartition du liquide de culture est faite soit à la pipette soit avec des burettes graduées.

Nous avons fait des ensemencements aussi larges que possible. Les souches sont conservées sur carotte dans des tubes de Roux. On utilise comme semence des cultures de 10 jours dont les spores sont émulsionnées dans 10 cc³ de sérum physiologique préparé avec de l'eau bidistillée et distribuées à la dose de 30 gouttes par ERLÉNMEYER. Les cultures sont faites à l'étuve réglée à 27°, température qui a paru la plus favorable. La plupart des organismes étudiés ont poussé sur nos milieux nitrates. L'*Aspergillus repens* a été l'un de ceux qui poussent le plus lentement.

Dans la méthode des voiles solides on utilise des voiles d'environ 4 à 6 jours obtenus sur un milieu ordinaire auquel on substitue aseptiquement un milieu semblable à ceux que nous venons de décrire.

CHAPITRE DEUXIÈME

LA MÉTHODE DES VOILES SOLIDES

D. BACH appelle ainsi une technique qui permet de mettre aseptiquement en contact avec un milieu adéquat le mycélium d'un champignon quelconque obtenu sur un autre milieu.

Nous pourrions ainsi étudier, par exemple, l'assimilation d'un nitrate sans avoir à attendre le développement de l'organisme sur un milieu titré supportant ainsi toutes les causes d'erreur dues à une longue culture, vieillissement, pigmentation, acidification, etc.

La méthode des voiles solides présente ainsi des avantages très nets sur l'ancienne technique de culture directe. De nombreux physiologistes l'ont utilisée. KOSTYTCHÉW et TSWETKO-WA (26) en 1921, BERNHAUER (13) en 1925, TAMIYA (72) en 1928, et cependant on ne trouve dans la littérature que fort peu d'indications sur les techniques à mettre en œuvre. Récemment BACH (9) a précisé certains points et justifié l'emploi de cette méthode en biologie végétale.

L'exposé de la technique telle que nous l'avons pratiquée dans le laboratoire se subdivise en 3 parties :

1°) *Préparation du milieu de culture.*

2°) *Obtention du mycélium et lavage.*

- (a) Appareil.
- (b) Technique du lavage en deux temps.
- (c) Durée du lavage.

3°) *Substitution du milieu définitif.*

- (a) Appareil.
- (b) Mesurage du milieu stérile.
- (c) Technique.

Enfin séjour à l'étuve et étude de la nouvelle culture.

Disons avant tout que ces différentes opérations gagneront à être effectuées dans une pièce spéciale, abritée de toutes poussières ou courants d'air.

PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE.

Je n'ai pas utilisé un milieu nettement défini. Comme il s'agit surtout d'obtenir des mycelium d'une épaisseur constante et aussi identique que possible entre eux, j'ai fait pousser mes Moisissures sur le milieu suivant :

Décocté de carotte	Q.S. pour 1.000
Peptone	10
Glucose	50
NaCl	50
Constante minérale	50

Le décocté est préparé en faisant bouillir 500 gr. de carottes coupées dans 2.000 gr. d'eau pendant 3 heures environ.

Finalement le milieu est filtré, ajusté à pH = 6,7 à l'aide de soude N/5 puis réparti en fioles coniques d'ERLENMEYER de 150 cc³ à raison de 25 cc³ par fiole.

Après stérilisation je conserve mes milieux à l'abri de la lumière afin d'éviter autant que possible le noircissement du liquide qui conduit à une culture d'*Aspergillus* moins fournie.

Après ensemencement et séjour à l'étuve j'obtiens, avec l'*Aspergillus repens*, en 4 à 5 jours, une culture à voiles uniformes d'un poids moyen de 30 ctg.

LAVAGE.

Le lavage est fait en trois fois avec de l'eau distillée stérilisée. Les opérations sont faites aseptiquement grâce à un appareil spécial.

On opère de la façon suivante. Tout d'abord on enlève le liquide d'une façon aseptique en utilisant l'appareil schématisé dans la figure 1.

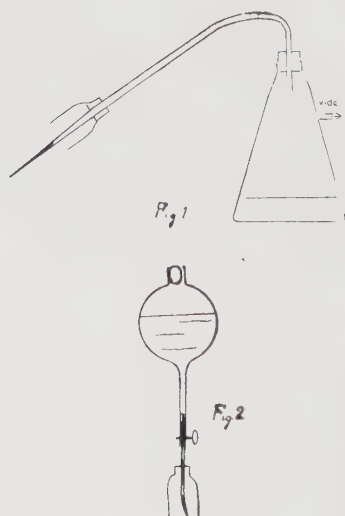
Il se compose d'une fiole tubulée, reliée à une trompe à vide. Au bouchon de cette fiole est adapté un tube de verre long

de 30 centimètres environ et à l'extrémité effilée duquel se trouve un manchon de verre protecteur, destiné à empêcher les poussières atmosphériques de tomber sur le col pendant l'opération. Pour utiliser cet appareil, on met en marche la trompe à vide, puis, après flambage on glisse l'extrémité effilée sous le voile du mycélium. Le liquide se trouve alors aspiré très rapidement dans le récipient. On dégage alors la fiole d'ERLENMEYER qui ne contient plus que le mycélium à sec sans liquide.

Il s'agit maintenant, avant de remplacer l'ancien liquide par la solution titrée, de laver aseptiquement le mycélium à étudier.

Pratiquement, on fait trois lavages successifs, espacés de trois en trois heures ; toutefois le dernier est fait immédiatement après le précédent, sans attendre. En opérant ainsi, on élimine complètement toutes traces du premier liquide. La technique de ces lavages est la suivante :

On prend un gros ballon *Pyrex* tubulé à la partie inférieure (fig. 2). Un tube en caoutchouc fort relie cette tubulure à un tube



effilé légèrement recourbé à sa partie inférieure, et d'une longueur d'environ 30 centimètres. L'appareil est rempli d'eau distillée, et bouché à sa partie supérieure avec du coton cardé ; la pointe de l'extrémité inférieure du tube de verre est scellée à la lampe. L'appareil entier est porté à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°. Après refroidissement on l'adapte à un support, on place une pince de MOHR sur le tube en caoutchouc et un manchon de verre à la partie inférieure du tube effilé. La pointe scellée est brisée et l'appareil, rempli d'eau est prêt à fonctionner.

On prend la fiole d'ERLENMEYER contenant le mycélium. On introduit alors la pointe effilée de l'appareil dans la fiole et on la fait glisser sous le voile et on introduit 20 à 25 cc³ d'eau sté-

rile dans la fiole. On flambe à nouveau avec beaucoup de soin. Pour soutirer cette eau de lavage on opère comme il a été dit au paragraphe précédent.

Après le dernier lavage on est en présence d'un mycélium sec et parfaitement lavé. Si on a bien opéré, ce mycélium n'est ni traumatisé ni contaminé (1).

SUBSTITUTION DU MILIEU.

Il s'agit maintenant de placer aseptiquement sous ce mycélium, la solution titrée que l'on veut étudier. Cette substitution est un peu plus compliquée que les lavages précédents car il s'agit maintenant de solutions titrées exactement mesurées. On y parvient en utilisant le dispositif de BACH (1927) (5).

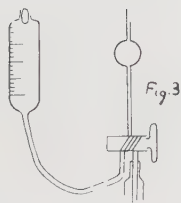
Cet appareil se compose :

1°) D'une allonge graduée en cc³.

2°) D'une pipette de construction spéciale.

L'extrémité inférieure de cette pipette est reliée à un robinet à deux voies obliquement placées ; l'une d'elles correspond à un long tube effilé, et l'autre à un tube recourbé. Un tube en caoutchouc relie ce tube recourbé à l'allonge graduée.

Le corps de la pipette porte deux graduations correspondant à un volume de 25 cc³. L'extrémité de l'allonge non reliée à la pipette et l'extrémité libre de la pipette sont bouchées avec du coton cardé puis capsulées. L'appareil est alors stérilisé à



(1) L'opération des lavages, telle que nous la décrivons ici, dure 8 à 9 heures mais si on en a le temps on peut la prolonger sans inconvénients un jour entier, en laissant la nuit comme intervalle entre le 1^{er} et le 2^{me} lavage par exemple.

l'autoclave (20 minutes à 120°). L'appareil stérile est enfin monté sur un support de la façon indiquée sur la figure III (1).

Après avoir flambé l'extrémité libre de l'allonge graduée, on introduit dans celle-ci la solution titrée (stérilisée au préalable) que l'on se propose d'étudier.

On ouvre alors le robinet de façon que le liquide pénètre dans la pipette. En faisant jouer ce robinet on fait couler la solution par l'extrémité effilée de la pipette jusqu'à ce que le liquide d'une part, remplisse complètement cette extrémité effilée, et d'autre part, affleure les repères supérieurs du corps de la pipette.

On adapte alors à cette pointe effilée un manchon de verre protecteur, destiné à empêcher les poussières atmosphériques de tomber sur la pointe pendant l'opération ; aucune bulle d'air ne doit se trouver à ce moment dans les tubulures de l'appareil. Si l'on opère correctement, le dispositif est prêt à fonctionner et la solution à étudier est stérile.

On place ensuite le liquide sous les mycelium contenus dans les ERLÉNMEYER en prenant toujours les précautions que nous avons signalées.

On a maintenant, dans la fiole d'ERLENMEYER, 25 cc³ exactement mesurés, d'une solution titrée stérile, recouverte du voile de l'organisme choisi exempt de traumatisme.

(1) Pour plus de détail sur la question nous renvoyons le lecteur à l'article original de BACH (B. S. P.) (5).

CHAPITRE TROISIÈME

RECHERCHES PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LA RECOLTE ET LES LIQUIDES DE CULTURE

Nous avons pratiqué sur la récolte et les liquides de culture les recherches suivantes :

- A) Pesée de la récolte ;
- B) Détermination du pH du liquide de culture ;
- C) Dosage de l'ammoniaque ;
- D) Dosage des nitrates.

A) — PESÉE DE LA RÉCOLTE.

On retire les fioles de l'étuve et à l'aide d'une pipette de précision on soutire exactement 1 cc³ du liquide de culture, qui nous servira ultérieurement à déterminer le pH du liquide de culture.

Le liquide est alors jeté sur deux filtres équilibrés, disposés sur un entonnoir de JOULIE. Le mycélium est lavé par décantation, puis sur le filtre à l'eau distillée. On a pris soin de rincer la pipette ayant servi au prélèvement de 1 cc³ dont nous venons de parler. Ces eaux de rinçage sont également jetées sur le double filtre. On lave le mycélium jusqu'à ce qu'on ait obtenu un volume total de 100 cc³ et ce qui correspond à une dilution de 24 à 100 pour le liquide de culture, puisque nous avons mis 25 cc³ de milieu par fiole et retiré 1 cc³.

Le mycélium est alors séché à l'étuve à 37°, puis à l'étuve à 100° pendant 4 à 5 heures. On le pèse à la balance de précision avec toutes les précautions habituelles.

Le centimètre cube prélevé et le filtrat de 100 cc³ servent alors aux recherches suivantes :

B) — DÉTERMINATION DU pH DU LIQUIDE DE CULTURE.

Le pH du milieu est déterminé sur l'échantillon prélevé directement avant toute manipulation. Cette méthode permet d'éliminer la cause d'erreur due au passage du liquide à travers la paroi des filtres.

On a constamment utilisé la méthode à la quinhydrone avec le montage de VEBEL et les électrodes poreuses.

C) — DOSAGE DE L'AMMONIAQUE.

Le dosage de l'ammoniaque, de même que celui des nitrates, se pratique sur les 100 cc³ provenant du lavage des mycélium et correspondant à 24 cc³.

L'ammoniaque a été dosée par entraînement à la vapeur d'eau dans le vide en utilisant une méthode inspirée de celle de YOVANOVITCH (1).

L'appareil comprend essentiellement deux tubes renflés en *Pyrex*, de 100 de capacité environ. Ces tubes se ferment avec des bouchons émeris à rodage normalisés, ce qui rend les divers tubes et bouchons rigoureusement interchangeables.

Le tube (*fig. IV*) ou tube laboratoire, reçoit la solution ammoniacale à doser. Son bouchon porte trois tubulures : un tube adducteur (*a*) amenant la vapeur d'eau et plongeant jusqu'au fond du tube où il se termine par une plaque perforée de trous, un tube central (*b*), surmonté d'un entonnoir à robinet pour l'introduction des réactifs, un tube adducteur (*c*) portant deux boules brise-mousse. Le tube (*b*) ou tube récepteur, contient la solution acide titrée, destinée à fixer NH_3 déplacée. Son bouchon possède les mêmes organes que le tube A, sauf l'entonnoir à robinet *b*. L'appareil se complète par un générateur de vapeur d'eau dont le bouchon de caoutchouc à trois trous porte : un thermomètre, un tube pour le départ de la vapeur d'eau, un tube à pointe effilée pour permettre d'avoir des bulles microscopiques destinées à entretenir l'ébullition.

(1) Pour de plus amples détails sur cette méthode nous renvoyons le lecteur à l'article original de Bach (1935) (7).

Ce tube en T permet de mettre l'appareil en communication avec l'atmosphère par le jeu d'un tube de caoutchouc et d'une pince à vis. Il est commode de disposer d'un thermostat où l'on immerge le générateur de vapeur d'eau et le tube A, pendant que le tube B plonge dans un bain d'eau froide courante.

Pratiquement on opère de la façon suivante :

Le thermostat étant amené à la température voulue, on place la solution acide en B, la solution ammoniacale en A. On relie successivement le tube B à la trompe puis au tube A. On ouvre le robinet de la trompe et on fait pénétrer l'alcali fixe destiné à déplacer l'ammoniaque ; pour ce, on manœuvre l'entonnoir à robinet. On relie aussitôt l'ensemble au générateur de vapeur d'eau. L'aspiration, qui doit être modérée pendant la première minute, est ensuite poussée à fond. Afin d'éviter les soubresauts violents qui pourraient amener un entraînement mécanique des gouttelettes liquides, on peut modérer le courant de vapeur par une pince à vis montée sur des connections en caoutchouc.

Nos conditions opératoires étaient les suivantes :

On prélève 5 cc³ de la solution à doser renfermant au plus 140 milligrammes d'azote ammoniacal pour 100 cc³. Ces 5 cc³ sont placés dans le tube A.

D'autre part on place 5 cc³ de solution d'HClN/35 dans le tube B. La température du thermostat étant de 67-70°, on met l'appareil en marche en faisant la manœuvre indiquée ; le vide obtenu à la trompe étant de 67-68 cc. de mercure. Au bout de 8 à 10 minutes tout l'ammoniaque étant déplacé on arrête l'opération et l'on fait tomber goutte à goutte dans le tube B une solution de soude N/35 jusqu'à virage du rouge de méthyle. Dans un paragraphe suivant nous indiquerons les calculs à faire pour exprimer les résultats de ces dosages.

D). — DOSAGE DES NITRATES.

Le dosage des nitrates a été effectué à l'aide de la méthode de DEWARDA selon la technique suivante (1).

(1) On trouvera dans l'article original de BACH (1933) tous les détails sur cette technique (8).

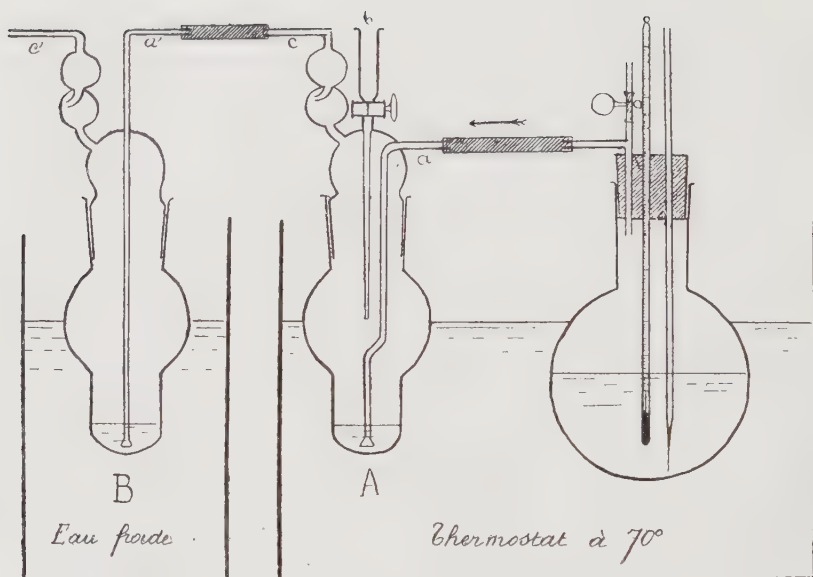


Schéma de montage de l'appareil d'entraînement de l'ammoniaque par la vapeur d'eau, dans le vide.

L'alliage de DEWARDA est de composition suivante :

Cu	50 %
Al	45 %
Zn	5 %

En milieu alcalin, il décompose l'eau, avec dégagement d'hydrogène qui est capable de réduire l'acide nitrique.

On utilise pour le dosage l'appareil décrit pour le dosage de l'ammoniaque. Le tube laboratoire A, dans lequel on a introduit 5 cc³ de la solution renfermant au maximum 3 mmgr. d'N nitrique et 0 gr. 25 d'alliage de DEWARDA est placé dans le thermostat réglé à 70° et relié au tube B renfermant l'acide titré et immergé lui-même dans un bain d'eau froide. On pratique une aspiration modérée et on fait tomber 0^{cc}50 de soude 2N dans le tube A qui est aussitôt mis en relation avec le ballon générateur de vapeur d'eau. On élève rapidement le vide jusqu'à 70 cc. de mercure et on continue l'aspiration pendant dix minutes. La réduction du nitrate étant complète à la 5^e minute, toute l' NH_3 formée distille avant la fin de l'opération. On dose alors

l'acide en excès par la soude N/35 en présence de rouge de méthyle comme indicateur.

On doit régler l'intensité du courant gazeux de manière à éviter la dilution ou la concentration exagérée du liquide placé en A.

REMARQUE. — Il faut noter que l'alliage de DEWARDA apporte une petite quantité d'N ammoniacal qui vient s'ajouter à l' NH_3 fournie par la réduction des nitrates et il importe de la défalquer de celle-ci. Plusieurs dosages effectués sans nitrates, mais avec 0,25 cgr. d'alliage ont toujours nécessité l'emploi de 0,04 cc³ d'HCl N/35.

Il convient donc pour un dosage de nitrate de retrancher 0,04 du nombre de cc³ d'HCl trouvé lorsqu'on utilise une solution N/35.

E) — CALCUL DE N/NO_3 ET DE N/NH_3 D'APRÈS LES DOSAGES FAITS EN SUIVANT LES TECHNIQUES PRÉCÉDENTES.

L'emploi de solutions titrées nous permettent de passer facilement du volume de HCl utilisé à la fin de nos dosages à l'azote contenu dans la prise d'essai, puis à l'azote contenu dans le liquide de culture d'une fiole d'ERLENMEYER (soit 25 cc³ de milieu). Il nous suffira, en effet, de multiplier le volume mis en jeu par des coefficients simples.

I. — Azote ammoniacal.

En utilisant de l'HCl N/35 et en faisant le dosage sur 5 cc³ de milieu dilué au quart, il suffit d'appliquer la formule suivante :

$$\text{N} = \text{V} \times 0,4 \times 20 = \text{V} \times 8$$

N = étant le nombre de milligrammes d'azote contenu dans les 25 cc³ de milieu de l'ERLENMEYER.

V = étant le nombre de centimètres cubes de HCl employés dans la dernière partie du dosage.

0,4 étant un coefficient correspondant à l'emploi de la solution N/35. Il est obtenu de la façon suivante :

On part de Az = 14. Donc pour chaque cc³ N/35 il y aura

14/35 milligrammes d'azote :

$$c = 14/35 = 0,4$$

20 c'est un coefficient correspondant à la dilution de la solution où l'on dose l'ammoniaque.

Le dosage porte, en effet, sur 5 cc³ de liquide dilué au quart (25 cc³ de milieu sont portés à 100). Ces 5 cc³ contiennent en réalité 1,25 cc³ de milieu initial, d'où l'obligation de multiplier le résultat par 20 pour ramener l'azote trouvé à 25 cc³ de milieu initial (20 × 1,25 = 25). (Voir plus loin la correction à appliquer si l'on utilise des milieux dilués de 24 à 100. — Cas des milieux où l'on prélève 1 cc³ pour la détermination du pH).

II. — Azote nitrique.

La même formule $N = V \times 8$ s'applique pour le dosage de l'azote nitrique.

N = étant le nombre de milligrammes d'azote nitrique contenu dans les 25 cc³ de milieu initial.

V = étant le nombre de cc³ d'HCl $N/35$ mis en jeu dans la dernière partie du dosage.

8 = étant le coefficient calculé précédemment.

Cependant le chiffre V est trop fort de 0,04 par suite de la petite quantité d'azote ammoniacale contenue dans l'alliage de DAWARDA. On devra donc appliquer pour le calcul de l'azote nitrique, la formule :

$$N' = (v - 0,04)8$$

REMARQUE. — Dans la plupart de nos expériences le pH a été déterminé sur 1 cc³ de milieu prélevé à la pipette sur les 25 cc³ contenus dans les ERLÉNMEYER. Cela conduit, pour les dosages d'azote nitrique et ammoniacale à effectuer une correction aux chiffres obtenus à l'aide des formules précédentes, car les dosages étaient alors pratiqués sur 24 cc³ au lieu de 25 cc³.

Le coefficient de correction est facile à établir :

$$\text{On a } x/n = 25/24 \text{ d'où } x = (25/24)n = n \times 1,0416$$

Donc les chiffres obtenus seront multipliés par le facteur 1,0416.

F) — PRÉSENTATION DES RÉSULTATS.

D'une manière générale les résultats de nos dosages d'azote nitrique et ammoniacal seront systématiquement présentés de la même manière dans tous nos comptes rendus expérimentaux.

Nous avons dosé avant chaque expérience l'azote ammoniacal et nitrique contenus dans chaque ERLLENMEYER.

Dans tous les résultats qui vont suivre nous n'avons jamais relevé sur les tableaux le nombre de cc³ d'HCl, ni indiqué les calculs, mais nous avons simplement indiqué le nombre de milligrammes d'azote exprimé tantôt en N/NH³ tantôt en N/NO³, azote total ou consommé calculé pour 25 cc³ de milieu.

IV

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE DE L'ASSIMILATION DE LA MOLÉCULE NITRIQUE PAR L'ASPERGILLUS REPENS

Pour étudier l'assimilation de l'ion NO^3 par l'*Aspergillus repens*, nous nous sommes d'abord adressé au nitrate de potassium $\text{NO}^3\text{K} = 101$.

Nous avons étudié l'assimilation nitrique de l'*Aspergillus* en faisant des cultures à différents pH.

Le dosage de l'azote nitrique permet de suivre sa disparition progressive.

L'ammoniaque, dosée dans les conditions expérimentales précédemment décrites, représente l'ammoniaque issue de la réduction du nitrate et retrouvée dans le milieu extérieur.

La méthode en culture directe s'est montrée rapidement imparfaite pour des raisons que nous exposerons un peu plus loin.

C'est ainsi que nous avons été amenés à employer la méthode dite « des voiles solides », qui nous a permis la mise en évidence du phénomène. Dans un autre chapitre, nous traiterons de l'assimilation du nitrate d'ammoniaque qui mérite une étude spéciale, car l'on peut, avec ce sel, comparer pas à pas l'assimilation de l'acide nitrique et l'assimilation de l'ammoniaque.

Ces milieux sont stérilisés à 115° dans les ERLÉNMEYER de 150 cc.

Les myceliums utilisés sont des mycéliums de 4 jours, bien constitués, épais, de couleur jaune vert. Deux d'entre eux, prélevés au début de l'expérience et à titre de témoins ont donné un poids moyen de 0 gr. 2765.

On a substitué le liquide de culture à raison de 50 cc. par fiole et on a placé à l'étuve à 27°.

A intervalle régulier on a prélevé aseptiquement 7 cc. de liquide (5 cc. pour le dosage de l'N/NH³, 1 cc. pour le pH et 1 cc³ pour la caractérisation du sucre).

Les résultats sont relevés sur le tableau suivant :

TABLEAU N° 1

Méthode des voiles. Myceliums d'*Aspergillus repens* placés sur milieux sans azote ajustés à différents pH.

série N°	P H ini- tial	12 heures			36 heures			4 jours		
		P H	N/NH ³ formé en mmg	sucres	P H	N/NH ³ formé en mmg	sucres	P H	N/NH ³ formé en mmg	sucres
1	4,16	4,03	0,07	+	4	0,06	+	3,90	0	+
		4 05	0,04	+	3,95	0,04	+	3,90	0,05	+
2	4,47	4,46	0	+	«	0,08	+	«	0,07	+
		4,37	0	+	«	0,06	+	«	0,05	+
3	4,80	4,51	0,12	+	4,25	0,05	+	3,93	0,08	+
		4,59	0,08	+	4,57	0	+	4,26	0,04	+
4	5,15	4,76	0,01	+	4,71	0	+	4,29	0,07	+
		4,85	0,07	+	4,47	0	+	4,54	0,10	+
5	5,50	5,15	0 05	+	4,57	0,04	+	4,30	0	+
		5,05	0,06	+	4,80	0,05	+	4,38	0,07	+
6	5,80	5,55	0,04	+	4,96	0,02	+	4 46	0,05	+
		5,66	0,08	+	4,80	0,01	+	4,93	0,15	+
7	6,10	5,93	0,05	+	5,36	0	+	4,68	0,07	+
		5,85	0,09	+	5,47	0,05	+	4,74	0,08	+
8	6,50	»	0,01	+	5,39	0,04	+	4,93	0,09	+
		5,67	0,04	+	5,50	0,05	+	4,94	0,10	+

Ces résultats nous montrent nettement que sur milieu sucré, tamponné, mais sans azote, il n'apparaît pas d'ammoniaque en quantité appréciable, même au bout de 4 jours de contact.

L'ammoniaque, issue de la protéolyse, ne faussera donc pas nos résultats.

CHAPITRE II

ASSIMILATION DE NO^3K PAR CULTURE DIRECTE (Imperfection de la méthode).

Nous avons utilisé pour cette étude le milieu suivant :

NO^3K	10,10	cc^3
Constante	50	gr.
Citrate de Na	20	gr.
NaCl	20	(solution mère)
Glucose	50	»
Eau distillée, q. s.	500	»

On ajuste à des pH différents en suivant les indications du tableau suivant :

TABLEAU 1 *bis*

	O	I	II	III	IV	V	VI	VII	Observat.
Solution ...	100	100	100	100	100	100	100	100	
HCl N	0	0	5	10	15	20	35	50	
NaOH N ...	1	0	0	0	0	0	0	0	
Eau.. q.s.p.	200	200	200	200	200	200	200	200	
P H... ..	7	6,4	6	5,4	5	4,4	2,5	1	
Azote nitrique.....	35	35	35	35	35	35	35	35	

Les milieux étant ainsi préparés et ainsi ajustés, on les répartit dans des fioles d'ERLENMEYER à raison de 25 cc. par fiole et l'on stérilise. Les fioles sont alors ensemencées et placées à l'étuve.

On les retire au bout d'un temps déterminé. Dans le liquide on prend le pH et l'on dose l'azote nitrique et ammoniacale,

On pèse le mycélium après séchage à l'étuve à 90°.

SÉRIE ACIDE. — EXPÉRIENCE N° 1.

On a préparé 3 séries de 6 fioles avec les milieux portant les numéros V, VI, VII dans le tableau précédent correspondant à des pH de 1 à 4,4. Les fioles sont retirées les 6, 8 et 10 jours.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU 2

Culture directe sur milieu N/10 en NO³K ajusté à différents pH
(zone acide)

Série	P H initial	Temps en jours	Mycelium	P H	N/NH ₃	N/NO ₃	
					formé	résiduel	disparu
5	4,4	6	0,020	4,80	0,48	32,76	2,24
		8	0,025	5,70	0,50	29,35	5,65
		10	0,160	5,70	0,32	22,82	12,18
6	2,5	6	0,004	2,70	0,15	34,20	0,80
		8	0,016	2,80	0,20	34,	1,00
		10	0,020	3,00	0,10	33,50	1,50
7	1	6	0	n'a pas poussé			
		8	0				
		10	0				

Dans la série VII trop acide le mycélium ne s'est pas développé ; au contraire dans les séries V et VI, le champignon a proliféré ; au pH 2,5 encore un peu trop acide pour lui l'*Aspergillus repens* a assimilé un peu d'acide nitrique ; mais cette assimilation est bien plus nette à pH 4,4 où l'on constate jusqu'à 12 mmgr. d'N/NO³K fixé.

Alcalinisation du milieu par suite de la destruction de l'ion acide. Apparition d'azote ammoniacal.

SÉRIE PEU ACIDE. — EXPÉRIENCE N° 2.

On a préparé 2 séries de 6 fioles avec les milieux précédem-

dent décrits, portant les numéros III et IV dans le tableau N° 1 et correspondant à des pH de 5 et 5,4.

Les fioles sont retirées les 6, 8 et 10^e jours.

Les résultats sont relevés dans le tableau N° 3.

TABLEAU N° 3

**Culture directe sur milieu N/10 en NO³K ajusté à différents pH
(zone peu acide)**

Série	P H initial	Temps en jours	Mycélium	P H	N/NH ₃ formé	N/NO ₃	
						résiduel	disparu
3	5,4	6	0.029	5.5	0.08	29.20	5mmg 80
		8	0.100	6 10	0.45	25	10mmg
		10	0.250	7.30	0.90	26.90	8mmg 10
4	5	6	0 010	5.4	0.06	32.50	2mmg 50
		8	0.160	5 80	0 80	25	10. 00
		10	0.250	6.00	1	24.20	10. 80

Les résultats forment la suite des précédents. Le mycélium aux pH considérés fixe l'N/NO³ mais le maximum semble avoir été dans la série précédent (pH = 4,4). Au fur et à mesure que le milieu initial s'alcalinise l'N/nitrique est fixé moins énergiquement.

Alcalinisation du pH correspondant à la disparition de la molécule acide.

Apparition d'azote ammoniacale dans le milieu extérieur.

SÉRIE NEUTRE. — EXPÉRIENCE N° 3.

On a préparé, comme dans les expériences précédentes, 2 séries de 6 fioles avec les milieux déjà décrits, portant les numéros 0, I et II dans le tableau N° 1 correspondant à des pH respectifs de 6 et 6, 4 et 7.

Les fioles sont retirées les 6, 8 et 10^e jours.

Les résultats sont les suivants :

TABLEAU N° 4

Culture directe sur milieu N/10 en NO_3K ajusté à différents pH
(zone neutre)

Série	pH initial	Temps en jour	Mycelium	P H	N/NH ₃	N/NO ₃	
					forme	résiduel	disparu
0	7	6	0.070	7.45	0.00	34.20	0.80
		8	0.180	7.60	0.07	34	1
		10	0.180	7.55	0.05	34.50	0.50
1	6.4	6	0.050	6.70	0.10	34.10	0.90
		8	0.175	6.95	0.15	34.25	0.75
		10	0.1000	7.20	0.10	33	2
2	6	6	0.100	6.20	0.10	34.10	0.90
		8	0.175	6.50	0.15	34	1.00
		10	0.150	7.10	0.05	33.90	1.10

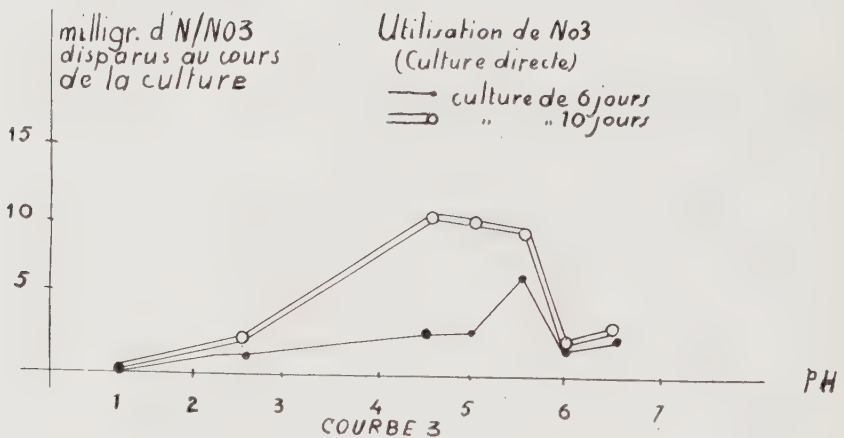
Dans cette expérience le milieu initial s'alcalinisant de plus en plus, l' N/NO_3 est fixé de moins en moins énergiquement par la cellule.

Le fait est particulièrement net dans les séries 1 et 0.

L'ammoniaque trouvée dans le milieu extérieur est assez faible, particulièrement dans la série II où l'on ne décèle que quelques dixièmes de milligrammes seulement.

CONCLUSIONS. - Les résultats que nous mentionnons ici, ne représentent en réalité qu'une tendance générale.

Aucun fait précis ne peut s'en dégager. Evidemment nous pouvons bien dire que le champignon pousse sur milieu nitraté et nous constatons bien une diminution de l'azote nitrique dans le milieu coïncidant avec une apparition d'azote ammoniacale. Nous pouvons même représenter graphiquement le phénomène. En portant en abscisse le pH et en ordonnée la quantité de nitrate disparue exprimée en milligrammes d'azote nous obtenons une courbe montrant que l'ion NO_3 disparaît au cours de la culture. Le fait étant surtout marqué lorsque la concentration en ions H du milieu de culture est compris entre les valeurs pH 4 et pH 5,5.



Cette expérience n'est, en somme, que la répétition d'innombrables expériences antérieures.

Sans remonter bien loin dans l'historique nous citerons celles de KOSTYTSCHEW, celles de SAKAMURA, celles de RIPPEL, etc...

Mais tous ces essais qui utilisent la technique de culture directe sont très imparfaites.

En effet, il faut fournir à la moisissure examinée, non seulement les corps dont on étudie le métabolisme mais les éléments normaux nécessaires à sa croissance même.

D'autre part, pour obtenir un mycélium suffisamment organisé et susceptible d'être étudié, il faut laisser la culture assez longtemps livrée à elle-même et l'organisme se trouve alors placé à la fin de la culture dans des conditions de réaction et de composition de milieu nettement différentes de celles du début.

Ces modifications peuvent alors cacher les faits que l'on veut mettre en évidence.

Par ailleurs on opère souvent dans des conditions initiales différentes les unes des autres, dans les diverses expériences successives (surtout au point de vue de la concentration en ions H du milieu de culture). C'est alors qu'au bout de temps identiques on obtient souvent, suivant les séries, des mycéliums de poids et quelquefois d'aspects très différents. Si bien que leurs

actions sur les corps étudiés sont difficilement comparables en raison des différences de poids des mycéliums mis en jeu.

On peut donc difficilement se baser sur de tels résultats pour révéler des faits précis.

Mais nous verrons du reste que la plupart de ces inconvénients disparaissent avec l'emploi de la méthode des voiles solides.

CHAPITRE III

ASSIMILATION DE NO_3K PAR LA MÉTHODE DES VOILES SOLIDES

Nous avons assez insisté sur cette méthode pour passer ici très rapidement sur sa technique.

Le voile est obtenu sur le milieu dont nous avons donné plus haut la formule (voir page 43). Le milieu utilisé pour la substitution est préparé comme suit : nous partons d'une solution mère, puis nous ajustons à des pH différents et complétons par de l'eau bi-distillée, de façon à obtenir une solution nitrée d'un titre connu en azote nitrique (N/10).

a) *Solution mère*
à dédoubler.

NO_3K	10,10	gr.
NaCl	20	»
Citrate de soude	20	»
Glucose	50	»
Constante minérale ...	50	cc ³
Eau bi-distillée, q. s. ..	500	»

b) On prépare les milieux à pH différents en se reportant au tableau suivant :

TABLEAU 5

	1	2	3	4	5	6
Solution mère... ..	150	150	150	150	150	150
HCl 2 N	24	12	10	6	0	
NaOH N/20.						30
Eau distillée qs pour.	300	300	300	300	300	300
pH obtenu	1.61	2.57	3.51	4.40	6.16	6.40

Les milieux étant placés aseptiquement à la dose de 25 cc. par fiole, sous les voiles d'*Aspergillus repens*, on place le tout à l'étuve à 27° — 28° et l'on abandonne le temps voulu. Sur chaque échantillon on prend le pH, et l'on dose l'azote sous ses formes nitrique et ammoniacale.

Le mycélium est séché et pesé. Toutes ces opérations sont effectuées en suivant les techniques exposées plus haut.

EXPÉRIENCE N° 4.

Série I. — Aspergillus repens, pH = 1,6.

Obtention du mycélium sur milieu au bouillon de carotte. Milieu substitué au nitrate de potasse (dont nous venons de donner la composition) et ajusté à pH 1,61.

On utilise 5 groupes de 2 fioles. Les mycéliums sont retirés deux à deux aux temps indiqués sur le tableau. On a ainsi pour chaque groupe deux séries de résultats (voir tableau n° 6).

Le titrage de l'azote nitrique effectué sur le milieu initial donne 35,30 milligrammes pour 25 cc.

L'examen du tableau 6 nous montre une consommation de l'ion nitrique, le phénomène étant surtout marqué à la 47^e heure où il disparaît environ 5 milligrammes d'acide nitrique.

Nous notons en même temps une apparition corrélative ou presque d'ammoniaque.

Rappelons que nous nous sommes mis à l'abri de la protéolyse. La série d'essais pratiqués avec des milieux sans azote, mais sucrés ayant établi que le mycélium en présence du sucre ne subit pas de protéolyse, tout au moins aux pH considérés (acide). (Voir tableau n° 1). La disparition progressive de l'ion NO_3 entraîne un déplacement du pH vers une zone moins acide.

TABLEAU 6

Voile substitué avec un milieu N/10 en NO_3K ajusté à $\text{pH} = 1,61$
(5 groupes de 2 fioles).

Groupe	heure	mycelium en gr.	pH initial	pH	Azote ammo- niacal	azote nitrique	
						résiduel	disparu
1	12 15	a	1,61	1.92	1.32	34.08	1.22
		b		1.89	1.40	33.64	1.66
2	24 h.	a	1,61	1.95	0.72	34.36	0.94
		b		1.96	0.48	34.32	0.98
3	47.30	a	1,61	2.08	1.88	32.80	2.50
		b		2.13	4.72	29.36	5.94
4	84 h.	a	1,61	2.11	2.44	32.20	3.10
		b		2.04	0.84	34.16	1.24
5	132 h.	a	1,61	2.16	2.88	32.32	2.98
		b		2.56	2.08	32.64	2.60

EXPÉRIENCE N° 5.

Série II. — Aspergillus repens, pH = 2,5.

Obtention du mycélium sur milieu à la carotte. Substitution après 4 lavages en 24 heures par milieu nitraté habituel, ajusté à $\text{pH} = 2,57$.

On utilise 5 groupes de deux fioles comme dans l'expérience précédente, chaque fiole renfermant 35 mmgr. d'azote nitrique pour les 25 cc³ de milieu. Les résultats sont relevés sur le tableau 7.

TABLEAU 7

Voile substitué avec un milieu N/10 en NO³K ajusté à pH = 2,57
(4 groupes de 2 fioles)

P H initial	Groupe	temps en heures	mycelium en grammes	P H	Azote am. moniacal formé	Azote nitrique		sucre
						résiduel	disparu	
2.57	1	11 h	0.304	3.56	6.28	27.68	7.32	+
			0.308	3.68	5.92	27.60	7.40	
2.57	2	24	0.480	4.99	3.08	12.76	22.24	+
			0.405	5.06	4.56	15.64	19.36	
2.57	3	48	0.581	5.67	2.00	9.28	25.72	+
			0.636	6.14	1.52	7.64	27.36	
2.57	4	72	0.518	9.34	4.44	9.60	25.40	0
			0.510	9.47	4.16	8.68	26.32	

Dans cette expérience nous voyons disparaître de l'azote nitrique et apparaître de l'azote ammoniacal.

À la 11^e heure N/NH³ égale presque N/NO³ disparu.

Le milieu se trouve dans la zone acide et le mycélium a peu augmenté de poids.

Plus tard et jusqu'à la 48^e heure on voit une grosse disparition de NO³H. Mais il n'apparaît plus d'ammoniaque et bien plus celle qui existait à la 24^e heure a semblé diminuer.

L'ammoniaque apparue dans les dernières heures est de l'ammoniaque de protéolyse. Le milieu se trouve alors dans une zone neutre et même alcaline, le mycélium diminue de poids et on ne retrouve plus de sucre.

L'examen du pH indique une alcalinisation lente entre les 11^e et 48^e heures, puis brutale à la 72^e heure par suite de la protéolyse commençante, avec, sans doute, attaque de la molécule citrique.

EXPÉRIENCE N° 6.

Série III. — *Aspergillus repens*, pH = 3,5.

Obtention du voile sur milieu à la carotte. Substitution après lavage en 24 heures par milieu nitraté habituel ajusté à $\text{pH} = 3,51$.

On utilise 5 groupes de 2 fioles comme dans les expériences précédentes. Le dosage de l'azote nitrique donne une teneur de 35 mmgr. pour 25 cc³.

Les résultats en sont notés sur le tableau 8.

Nous voyons que le champignon augmente nettement de poids.

On note une disparition de l'azote nitrique commençant dès la 11^e heure et atteignant 25 mmgr. à la 48^e heure.

Remarquons aussi que l'ammoniaque qui atteignait la dose de 4 mmgr. à la 11^e heure ne se retrouve plus qu'à la dose de 0.50 mmgr. à la 24^e tandis que la disparition de l'ion NO^3 ne fait qu'augmenter pendant le même temps.

TABLEAU 8

Voile substitué avec un milieu N/10 en NO^3K ajusté à $\text{pH} = 3,51$
(4 groupes de 2 fioles)

P H initial	Groupe	Temps en heures	Mycelium en grammes	P H	Azote ammo- niacal	Azote nitrique		
						résiduel	disparu	sucres
3.51	a	11	0.331	4.28	3.36	27.40	7.60	+
	b		0.359	4.36	4.16	26.32	8.68	
3.51	a	24	0.410	5.26	0.24	16.84	18.16	+
	b		0.477	5.50	0.56	14.24	20.76	
3.51	a	48	0.515	5.90	2.08	13.28	21.72	+
	b		0.577	6.58	1.28	9.76	25.24	
3.51	a	72	0.503	9.206	3.92	10.16	24.84	0
	b		0.474	9.02	3.32	11.84	23.16	

A la 72^e heure, comme dans l'expérience précédente, les conditions changent, du fait de la disparition du sucre. La protéolyse entre en jeu, l'alcalinisation est considérable, et le mycélium diminue de poids.

EXPÉRIENCE N° 7.

Série IV. — *Aspergillus repens*, pH = 4,4.

Obtention du mycélium sur milieu à la carotte. Substitution après lavage en 24 heures, par milieu nitraté habituel ajusté à pH = 4,40.

On utilise toujours 5 groupes de 2 fioles que l'on retire de l'étuve les 12, 24, 48, 84 et 132^e heures.

Le titrage de la fiole témoin indique une teneur de 35 mmgr. de N/NO³ par 25 cc³ de milieu.

Les résultats sont relevés sur le tableau 9. Nous y voyons que l'utilisation de N/NO³ est un peu moins importante que précédemment (maximum 16 mmgr. au lieu de 27 mmgr.).

Nous remarquons, en outre, que la teneur du milieu en N/NH³ est très faible, 0,4 mmgr. à 1 mmgr. alors que nous notons une consommation d'azote NO³ allant jusqu'à 16 mmgr. De ce fait, l'alcalinisation est légère, atteignant seulement pH = 7 à la 132^e heure.

Notons que pour cette série la protéolyse n'atteint faiblement le mycélium qu'à la 132^e heure et lorsque tout le sucre est consommé, on voit alors une faible diminution de poids et une alcalinisation légère.

TABLEAU 9

Voile substitué avec un milieu N/10 en NO_3K ajusté à $\text{pH} = 4,40$

(5 groupes de 2 fioles).

P H initial	Groupes	Temps en heures	Mycelium en grammes	p H	Azote ammoniacal	Azote nitrique		sucre
						résiduel	disparu	
4.40	a	12	0.228	4.55	0.48	31.40	3.60	+
	b		0.253	4.55	0.36	32.	3.	
4.40	a	24	0.251	4.90	1.20	28.92	6.08	+
	b		0.291	5.00	0.60	25.40	6.60	
4.40	a	48	0.373	4.89	0.24	21.88	13.12	+
	b		0.371	5.05	0.32	22.08	12.92	
4.40	a	84	0.364	5.67	0.32	20.00	15.	+
	b		0.351	5.88	0.40	20.20	14.80	
4.40	a	132	0.291	6.74	0.68	18.32	16.68	
	b		0.288	6.92	0.68	18.84	16.16	

EXPÉRIENCE N° 8.

Série 5. — *Aspergillus repens*, $\text{pH} = 6,1$.

Obtention du mycélium sur milieu à la carotte. Substitution après lavage en 24 heures par un milieu au nitrate de potassium ajusté à $\text{pH} = 6,16$.

Le titrage de la fiole témoin donne une teneur en N/NO_3 de 35,32 mmgr. pour 25 cc³ de milieu.

On utilise 5 groupes de 2 fioles retirées de l'étuve les 12, 36, 60, 84 et 110^e heures.

Les résultats relevés sur le tableau 10 confirment les précédents.

Il n'apparaît plus que des quantités négligeables d'ammoniaque. Nous sommes dans un milieu de moins en moins acide. La disparition de N/NO^3 reste importante. Les mycéliums augmentent de poids.

TABLEAU 10

Voile substitué avec un milieu N/10 en NO^3K ajusté à pH = 6,16
(5 groupes de 2 fioles).

P H initial	Groupes	Temps en heures	Mycélium en poids	P H	Azote ammoniacal	azote nitrique		sucre
						résiduel	utilisé	
6.16	1	12	0.215	6.05	0.24	33.80	1.52	+
			0.198	6.15	0.24	33.84	1.48	
6.16	2	36	0.276	6.00	0.40	27.24	8.08	+
			0.282	5.99	0.24	25.48	9.84	
6.16	3	60	0.416	5.68	0.16	18.24	17.08	+
			0.288	5.69	0.24	17.44	17.88	
6.16	4	84	0.368	7.02	0.68	18.08	17.24	+
			0.419	7.16	0.52	16.70	18.62	
6.16	5	110	0.367	7.13	1.28	18.48	16.84	0
			0.370	7.15	1.08	16.48	18.84	

L'alcalinisation du milieu se fait lentement. Protéolyse nette à la fin de l'expérience.

EXPÉRIENCE N° 9.

Série 6. — *Aspergillus repens*, pH = 6,4.

Obtention du mycelium sur milieu à la carotte. Substitution après lavage en 24 heures par un milieu habituel au NO^3K , ajusté à pH = 6,40. Le titrage de la fiole témoin montre une présence de 35 mmgr. de N/NO^3 par 25 cc³.

On utilise 5 groupes de 2 fioles retirées les 12, 36, 60, 84 et 120^e heures.

Résultat au tableau 11. Ils sont tout à fait comparables à ceux des séries précédentes. La quantité d'ammoniaque qui apparaît est de plus en plus faible.

TABLEAU 11

Voile substitué avec un milieu N/10 en NO^3K ajusté à pH = 6,40
(5 groupes de 2 fioles).

P H initial	Groupes	Temps en heures	Mycélium en grammes	P H	Azote am- moniacal en mmgr.	Azote nitrique		sucre
						résiduel en mmgr.	disparu	
6.4	I	12	0.215	6.25	0.28	33.68	1.32	«
			0.178	6.18	0.16	34.60	1.40	«
6.4	II	36	0.292	6.04	0.24	25.28	9.72	«
			0.285	6.05	0.36	24.24	10.76	«
6.4	III	60	0.378	5.65	0.24	20.80	14.20	«
			0.360	5.72	0.40	20.64	14.36	«
6.4	IV	84	0.429	7.35	0.43	16.56	18.44	«
			0.442	7.41	0.43	16.52	18.68	«
6.4	V	120	0.385	7.25	0.64	15.20	17.80	«

La disparition de l'azote nitrique est toujours importante, mais le phénomène va en se ralentissant avec l'alcalinisation du milieu initial. Lorsque le sucre disparaît tardivement vers la 120^e heure la protéolyse commence à libérer de l'ammoniaque ce qui alcalinise le milieu tandis que le mycélium diminue de poids.

DISCUSSION

Les faits que nous venons de mettre en évidence nous paraissent démontrer que le champignon est capable, en présence de sucre, de transformer l'acide nitrique en ammoniacque.

Notons que ces résultats sont surtout la vérification de nombreux travaux antérieurs. Avant nous KLEIN et ses élèves (23), puis SAKAMURA (64 à 68), RIPPEL (55), pour ne citer que les dernières publications, avaient déjà remarqué une consommation de l'ion nitrique.

Mais ces travaux, ainsi que nous l'avons signalé dans un chapitre précédent, ont eu à souffrir des inconvénients dûs à l'emploi de la méthode directe, et dont nous n'avons pas eu à nous occuper dans la série d'expériences que nous présentons, puisque nous avons employé la technique des voiles solides.

Par ailleurs, nous avons fait remarquer plus haut, que les résultats publiés jusqu'ici manquaient de netteté surtout lorsqu'il s'agissait d'expliquer l'utilisation des produits de réduction. (Voir page 61).

L'usage de la technique des voiles solides et l'application de quelques données physico-chimiques vont nous permettre de donner quelques éclaircissements à ce sujet.

Notons, avant tout, que nous avons d'abord vérifié que sur les milieux employés sans azote il n'apparaît pas d'ammoniacque de protéolyse.

Nous pouvons résumer nos expériences de la façon suivante :

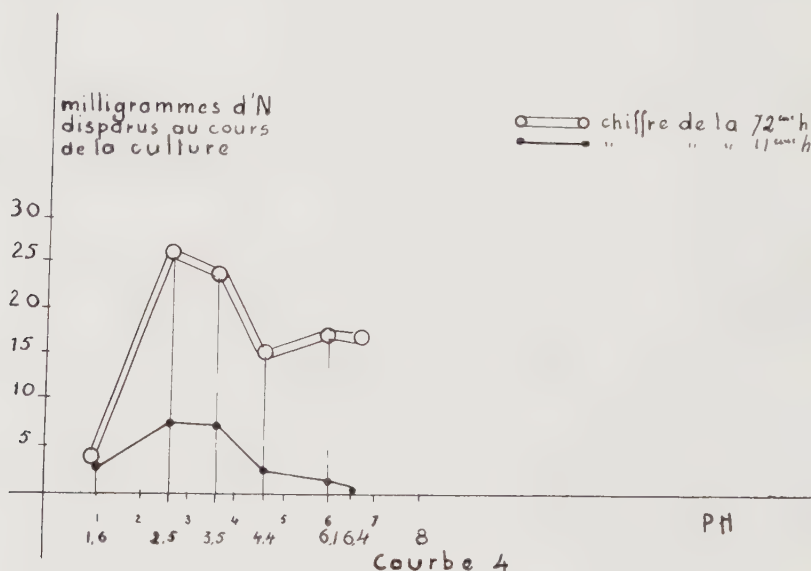
En milieu très acide (série n° 1) de $\text{pH} = 1,61$, on observe une transformation faible de l'ion nitrique en ion ammoniacal, mais la quantité d'azote ammoniacal apparue correspond assez bien au poids de l'azote nitrique disparu. On n'observe aucune augmentation de poids du mycélium.

En milieu moyennement acide (expérience effectuée à $\text{pH} = 2,57$) les résultats sont sensiblement du même ordre avec cependant une apparition plus considérable d'ammoniacque, près de 6 milligrammes à la 11^e heure.

Par contre, *en milieu neutre ou faiblement alcalin* ($\text{pH} = 4,4$ et au-delà) il n'apparaît plus que des quantités assez

faibles d'ammoniaque tandis que la consommation de l'azote nitrique reste assez grande et que les mycéliums augmentent de poids.

Si nous représentons graphiquement les résultats relatifs à la disparition de l'ion nitrique nous obtenons la courbe suivante :



Le maximum d'absorption de l'ion nitrique est donc dans la zone acide.

On note une opposition très nette entre les expériences effectuées en milieu acide, et celles effectuées en milieu neutre.

Expérimentalement que voit-on ? Considérons les expériences 4 et 9.

Dans les deux cas extrêmes choisis, la quantité d'azote nitrique disparue était importante (de 1,5 à 3 mmgr. environ par 25 cc³ pour l'expérience en milieu acide, et de 1,5 à 18 pour l'expérience en milieu neutre ou faiblement alcalin).

L'azote ammoniacale que nous retrouvons provient incontestablement de la transformation de l'azote nitrique.

Or, dans la série acide cette ammoniaque est retrouvée dans le milieu extérieur, tandis que l'on remarque que le mycélium ne croît pas.

Au contraire, en milieu neutre ou alcalin, l'ammoniaque ne se trouve qu'en quantité infime dans le milieu extérieur tandis que le mycélium augmente de poids.

Quelle explication pouvons-nous en donner ?

L'acide nitrique vient d'être réduit en ammoniaque dans la cellule. Cette ammoniaque y prend un état de dissociation réglée par le pH du protoplasme, légèrement acide d'ailleurs. NH^3 se trouve donc en partie à l'état de molécule non ionisée (NH^4OH) qui s'hydrolyse en (NH^3) et (H^2O). L'ammoniaque sous la forme NH^3 atteint vite une certaine tension intra-cellulaire. Et comme elle est sous une forme très apte à traverser la membrane il se produit une exosmose d'ammoniaque.

Considérons maintenant nos deux cas extrêmes.

1°. — LE MILIEU EXTÉRIEUR EST TRÈS ACIDE.

Dans un milieu très acide, NH^4OH qui vient de sortir de la cellule se dissocie intégralement et la tension de l'ammoniaque moléculaire intra-cellulaire est toujours supérieure à celle du milieu extérieur.

Il y a donc une exosmose de NH^4OH au fur et à mesure de sa formation dans la cellule.

L'ammoniaque tend donc à sortir de la cellule au fur et à mesure de sa formation, le mycélium souffre « d'une véritable faim en azote » et son développement est réduit.

2°. — MILIEU ALCALIN.

Mais, en milieu neutre ou alcalin, les conditions sont toutes autres. Ainsi que nous l'avons déjà dit le pH intracellulaire reste invariablement compris dans la zone peu acide.

Les premières quantités d'ammoniaque qui passent dans la solution extérieure ne s'y ionisent qu'incomplètement : la ten-

sion de NH_3 dans ce milieu atteint vite une valeur suffisamment élevée pour que toute nouvelle exosmose de molécules devienne impossible.

La cellule conserve donc à sa disposition l'ammoniaque produite et peut effectuer sa synthèse protéique : les mycéliums augmentent de poids.

Naturellement entre ces cas extrêmes on a toute la gamme des résultats intermédiaires. Il suffit du reste de jeter un coup d'œil sur les tableaux N° 7, 8, 9, 10 et 11 pour voir que les résultats s'interprètent facilement si l'on admet les données précédentes.

CHAPITRE IV

ASSIMILATION DU NITRATE D'AMMONIAQUE PAR LA MÉTHODE DE CULTURE DIRECTE ET CELLE DES VOILES SOLIDES

L'utilisation, par le mycélium, du nitrate d'ammoniaque va nous permettre d'étudier l'assimilation simultanée de l'ion NH_3 et de l'ion NO_3 .

Ce sel présente un intérêt particulier du fait que le radical acide est aussi assimilable que le radical alcalin, et qu'en outre la présence, dans la même molécule, d'azote nitrique et d'azote ammoniacal permet de déterminer par des dosages comparatifs la forme de l'azote que le champignon préfère suivant le pH considéré.

Rappelons brièvement que, dès 1889, LAURENT (29) nota que certains champignons absorbent l'azote des nitrates de préférence à l'azote de l'ammoniaque. Mentionnons en outre les travaux de SCHLOESING et MUNTZ (69), de MALFITANO (36), ceux de BUTKEWITSCH (16), de NIKITINSKY (44), de BRENNER (15). (Voir historique page 8). Dans le travail de RITTER on remarque que la consommation de l'ion nitrique est réglée par la dose de nitrate employée.

Nous avons également vu qu'en 1925 D. BACH (2) avait étudié le sujet dans sa thèse en opérant sur l'*Aspergillus repens* et conclu qu'à l'inverse de l'*Aspergillus niger* son champignon attaque énergiquement l'ion nitrique en présence d'ammoniaque et d'une façon presque aussi précoce. Cependant, il indique que la consommation respective des deux formes semble réglée dans une certaine mesure par la réaction initiale. Il montre, à cette occasion, que dans les milieux acides ($\text{pH} = 3,6$) la consomma-

tion de l'ion nitrique, cause d'alcalinisation, l'emporte sur celle de l'ion ammoniacale, cause d'acidification, et que, dans les milieux peu acides ($\text{pH} = 5$ et 8), la consommation de l'ion ammoniacal est le phénomène prédominant.

En 1930, T. SAKAMURA (67), étudie soigneusement le mécanisme de l'absorption de NH_3 et de NO_3 tel que nous l'avons exposé ultérieurement.

Il a tendance, comme MEVIUS (1929) (40), à admettre que l'ammoniaque est surtout absorbé sous forme moléculaire (1).

Enfin nous savons qu'en 1931 RIPPEL (55) a émis l'hypothèse que le P. I. E. du cytoplasme dominait le problème de l'assimilation de l'azote sous ses diverses formes.

Quoi qu'il en soit, nous nous sommes proposés dans ce chapitre, de reprendre l'étude de cette assimilation, et nous avons d'abord refait les expériences avec la méthode de culture directe. Puis, afin de dégager des conclusions nettes, nous avons repris le problème en utilisant la méthode des voiles solides.

A. — Assimilation par la méthode de culture directe

Les milieux employés sont des formules très voisines les unes des autres. Ils comprennent toujours à côté du nitrate d'ammoniaque, du glucose, du citrate de soude, du chlorure de sodium et la constante minérale.

Nous préparons toujours une solution mère, puis nous ajustons les milieux à différents pH en se reportant aux données du tableau (12).

La solution mère avait pour formule :

A dédoubler	}	Nitrate d'ammoniaque	8 gr.
		Glucose	50 gr.
		Constante minérale	50 gr.
		Citrate de soude	20 gr.
		Chlorure de sodium	20 gr.
		Eau distillée q. s.	500 cc ³

(1) SAKAMURA pense, que dans une culture contenant à la fois N/NO_3 et N/NH_3 , l'*Aspergillus cryzæ* absorbe de préférence tantôt NO_3 tantôt NH_3 et qu'un grand nombre de facteurs peuvent influencer le phénomène : en particulier la réaction du milieu.

TABLEAU 12

Milieux	I	II	III	IV	V	VI
Solution mère	50	50	50	50	50	:
HCl 2N.....	13.4	9.40	5 60			
NaOH 1/5				2	4	
Eau distillée qs.....	100	100	100	100	100	
PH	3.37	4.38	5 28	6.26	7.24	

Les milieux ainsi préparés sont placés dans des fioles d'ERLENMEYER de 250 à la dose de 25 cc³ par fiole et stérilisés à 115°, on dose chez les témoins l'N/NO³ et l'N/NH³ et l'on prend le pH. On ensemence largement à l'aide d'une émulsion de spores d'*Aspergillus repens* et l'on porte à l'étuve à 27° le temps voulu.

On retire les fioles, on dose l'N/NO³ et l'N/NH³ et on prend le pH dans le liquide de culture tandis que l'on pèse le mycélium sec.

EXPÉRIENCE N° 10.

Aspergillus repens et nitrate d'Ammoniaque, série acide.

Milieu habituel constitué par les solutions portant les numéros 1 et 2 sur le tableau 12.

3 séries de fioles retirées les 3, 5 et 8° jours.

Les titrages des témoins et les résultats sont relevés sur les tableaux 13 et 14.

TABLEAU 13

(Témoins de l'expérience N° 12)

Séries	pH	N	N
		ammoniacal	nitrique
1	3.37	35	35
2	4.38	35	35

TABLEAU 14

Culture directe sur milieu N/10 en $\text{NO}_3^-(\text{NH}_4^+)$, ajusté à des pH acides

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	P H	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					total	disparu	total	disparu
3.37	1	3	0.004	3.23	34.36	0.64	33.36	1.64
		5	0.002	3.41	34.52	0.48	34.56	0.44
		8	0.016	3.28	33.48	1.52	33.76	1.24
4.38	2	3	0.008	4.24	33.08	1.92	33.56	1.44
		5	0.095	3.95	26.16	8.84	33.20	1.80
		8	0.239	4.24	17.32	17.68	31.86	3.14

L'examen de ce tableau montre que le mycélium, surtout dans la série 1, n'a pas beaucoup augmenté de poids. Cependant, comme dans les expériences précédentes, nous voyons qu'au 8^e jour, et en milieu acide, l'attaque de l'ion NO_3^- s'effectue nettement (pres de 4 mmgr. dans la série 2).

EXPÉRIENCE N° 11.

Aspergillus repens, nitrate d'ammoniaque, milieu peu acide.

Milieu habituel. Milieux ajustés suivant les indications des séries 3 et 4 du tableau 12.

3 groupes de fioles retirées les 3, 5 et 8^e jours.

Le titrage des témoins et les résultats expérimentaux sont relevés dans les tableaux 15 et 16.

TABLEAU 15

Séries	pH	N	N
		ammoniacal	nitrique
3	5,28	35	35
4	6,26	34,4	35

TABLEAU 16

Culture directe sur milieu N/10 en $\text{NO}_3(\text{NH}_4)$, ajusté à des pH peu acides.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	P H	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
5.28	3	3	0.010	5.14	32.44	2.26	33.64	1.36
		5	0.108	4.86	25.12	9.88	32.68	2.32
		8	0.242	5.66	19.56	15.44	24.08	10.92
6.26	4	3	0.045	6.01	31.68	2.80	33.80	1.20
		5	0.121	5.52	22.88	11.60	33.68	1.32
		8	0.223	5.64	15.40	19.08	29.80	5.20

La consommation de l'ion nitrique est très forte le 8^e jour dans la série 3. Elle décroît rapidement dès que nous passons à la série 4 (pH = 6). Les mycéliums ont augmenté nettement de poids, surtout si nous les comparons à ceux de la série précédente.

EXPÉRIENCE N° 12.

Aspergillus repens, milieux neutres au nitrate d'ammoniaque.

Milieu habituel ajusté suivant les indications portées sur le tableau 12 à la série N° 5. Trois fioles retirées les 3, 5 et 8^e jours.

Les tableaux 17 et 18 donnent les résultats du dosage des témoins et les résultats expérimentaux.

TABLEAU 17

Séries	pH	N/NH ³	N/NO ³
5	7.24	33.12	35

TABLEAU 18

Culture directe sur milieu N/10 en NO_3H (NH_4^+) ajusté à un pH neutre

pH initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en poids	pH	N. ammoniacal		N. nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
7.24	5	3	0.023	6.49	28.84	4.28	33.96	1.04
		5	0.139	5.97	19.04	14.08	33.36	1.64
		8	0.291	5.87	9.72	21.40	29.68	5.32

Dans cette série, la plus alcaline, on observe la plus grande consommation d'azote ammoniacal de ces 5 groupes d'expériences.

L'utilisation de l'ion NH_3 libérant l'ion acide, on observe une acidification du milieu.

*
**

Nous relatons maintenant quelques expériences dans lesquelles nous avons utilisé un milieu de *formule un peu différente* de celui utilisé précédemment.

EXPÉRIENCE N° 13.

Aspergillus repens et *nitrate d'ammoniaque*.

Le milieu de culture utilisé avait la formule suivante et était fortement tamponné avec 7 % de citrate.

Nitrate d'ammoniaque	8 gr.
Glucose	50 »
Constante minérale	50 »
Citrate de soude	70 »
Chlorure de sodium	20 »
Eau distillée, q. s.	1.000 »

Ce milieu est divisé en 3 séries que l'on ajuste à des pH différents.

Pour chaque série on place à l'étuve 3 groupes de 2 fioles que l'on retire les 3, 5 et 9^e jours.

Le titrage des témoins donne les résultats suivants :

TABLEAU 19

Séries	pH	N. Ammoniacal	N. nitrique
1	3.21	35	35
2	3.70	35	35
3	4.45	32.80 (1)	35

L'examen des résultats portés sur le tableau 20 nous montre tout d'abord que le pH n'a varié que dans d'étroites limites : de 3,2 à 4,5, de 4,6 à 4,5 et de 5,8 à 5,9, grâce à la forte dose de tampon utilisée. En outre dans la série 1, acide, le mycélium ne donne, au bout de 9 jours, que 15 milligrammes. Il a été certainement gêné dans son développement. Dans les trois séries, il y a eu consommation d'azote ammoniacal, avec un maximum du côté alcalin (série 3).

La consommation de l'azote nitrique est moins nette, le maximum semblant atteint avec la série 2.

(1) Cette teneur en azote ammoniacal plus faible pour cette série qu'aux 2 séries précédentes s'explique par la perte d'ammoniaque à la stérilisation. (Voir page 40).

TABLEAU 20

**Culture directe sur milieu fortement tamponné, N/10 en $\text{NO}_3(\text{NH}_4)$,
ajusté à différents pH.**

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycelium en grammes	P H	N. ammoniacal		N nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.21	1	3	0.003	3.21	33.67	1.33	34.23	0.77
			0.001	3.25	33.88	1.12	34.72	0.28
		5	0.0035	3.15	33.6	1.40	32.97	2.03
			0.0075	3.14	32.9	2.10	32.06	2.94
		9	0.016	3.15	31.60	3.40	33.72	1.28
			0.012	3.17	30.12	4.88	32.64	2.36
		3	0.020	4.64	32.20	2.80	32.76	2.24
			0.008	4.63	32.06	2.91	33.32	1.68
3.70	2	5	0.101	4.61	28	7	29.75	5.25
			0.069	4.62	23.96	11.04	28.21	6.79
		9	0.244	4.49	15.84	19.16	23	12
			0.197	4.57	18.32	16.68	24.04	10.96
		3	0.0575	5.87	24.99	7.81	33.67	1.33
			0.051	5.82	25.48	7.32	22.69	2.31
4.45	3	5	0.203	5.11	12.25	20.55	32.62	2.38
			0.119	5.18	12.53	20.27	31.5	3.50
		9	0.178	5.64	11.60	21.20	32.28	2.72
			0.180	5.93	11.96	20.84	31.48	3.52

EXPÉRIENCE N° 14.

Aspergillus repens et nitrate d'Ammoniaque.

Le milieu employé est moins tamponné que le précédent et la pression osmotique est moins élevée.

Nitrate d'ammoniaque	8 gr.
Glucose	50 »
Constante minérale	50 »
Citrate de soude	15 »
Chlorure de sodium	15 »
Eau distillée, q. s. pour	1.000 »

Ce milieu est divisé en 3 séries que l'on ajuste à des pH différents. Pour chaque série on place à l'étuve 3 groupes de 2 fioles que l'on retire les 4, 7 et 12^e jours.

Témoins au tableau 21.

Les résultats de cette expérience sont très nets (tableau 22). La consommation de l'ion NH^3 a augmenté au fur et à mesure que le pH allait vers les régions alcalines : de 2 à 13 mmgr. utilisé à pH = 3,4; de 2 à 15 mmgr. à pH = 5 et de 6 à 16 à pH = 6,4.

La consommation de l'ion NO^3 se fait en sens inverse de 1 à 14 mmgr. à pH = 3 ; de 1,5 à 9 à pH = 5 et de 1 à 6 à pH = 6.

Dans ces trois séries le champignon utilise l'ion NO^3 à côté de l'ion NH^3 et les variations de pH ne sont pas très grandes.

TABLEAU 21

Témoins de l'expérience 11

Séries	pH	N. ammoniacal	N. nitrique
1	3.42	34.60	34.60
2	5.23	34.60	34.60
3	6.41	32.90 (1)	34.60

(1) Diminution due à la stérilisation.

TABLEAU 22

**Culture directe sur milieu peu tamponné, N/10 en NO_3 (NH_4),
ajusté à différents pH.**

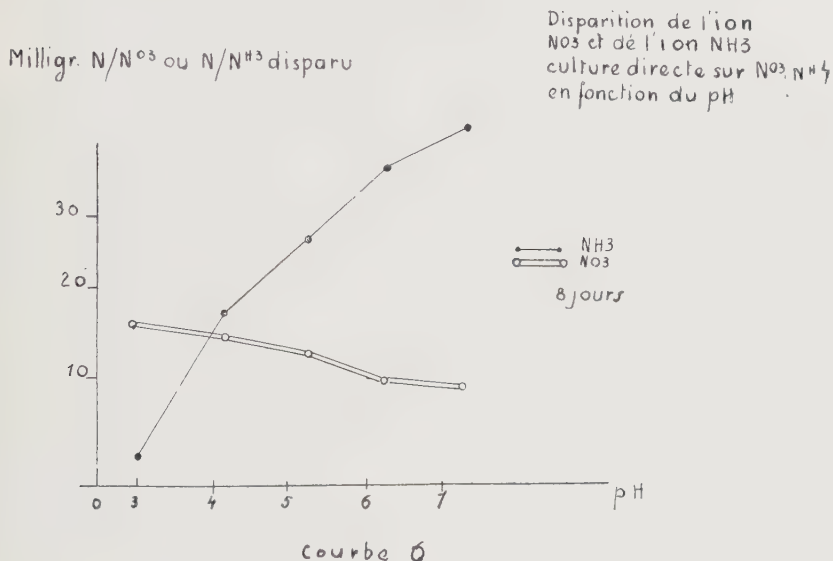
pH initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.42	1	4	0.007	3.37	32.08	2.52	33.90	0.80
			0.009	3.37	31.92	2.70	33.60	1.00
		7	0.107	2.94	26.68	7.92	31	3.60
			0.084	3.12	28.12	6.48	31.20	3.40
		12	0.142	5.11	21.76	12.84	20.80	13.80
			0.159	4.29	21.36	13.24	20.32	13.28
		4	0.019	5.107	32.48	2.12	33.04	1.56
			0.028	5.16	31.44	3.14	32.8	1.80
		7	0.083	4.94	28	6.60	31.04	3.56
			0.097	4.92	28.44	6.16	30.14	4.36
		12	0.170	6.97	19.12	15.48	25.04	8.96
			0.156	6.74	19.88	14.72	24.92	9.68
6.41	3	4	0.052	5.59	26.80	6.10	33.16	1.44
			0.051	5.64	27.68	5.22	33.12	1.48
		7	0.185	5.15	19.72	13.28	30.60	4
			0.156	5.32	22	10.90	31.44	3.16
		12	0.164	6.44	15.52	17.38	28.24	6.136
			1.172	6.42	15.52	16.42	28.36	6.24

CONCLUSION SUR CES EXPÉRIENCES DE CULTURE DIRECTE

Les résultats dans cette série d'expériences sont assez nets.
On observe une disparition de l'ion NO_3 en milieu acide et

une disparition de l'ion NH_3 en milieu neutre ou faiblement alcalin.

Si l'on représente par une courbe les expériences les plus démonstratives (expériences N° 10, 11 et 12, voir page 80) en portant en abscisse le pH des milieux de culture et en ordonnée l'azote disparu exprimé en milligrammes le phénomène apparaît assez nettement.



Le maximum de disparition de l'ion NO_3 a lieu dans la zone acide tandis qu'il se trouve dans la zone alcaline pour l'ammoniaque.

Comme nous l'avons fait pour l'étude de l'assimilation de NO_3K nous allons compléter ces expériences par des essais effectués en utilisant la méthode des voiles solides afin d'éviter l'imprécision des résultats obtenus avec la méthode de culture directe.

B. — Assimilation par la méthode des voiles solides

Le voile étant obtenu sur le milieu à la carotte dont nous avons donné la composition (voir page 43) on opère la subs-

titution de milieu, en suivant la technique indiquée, avec le nouveau milieu préparé comme suit :

On part de la solution mère suivante :

A dédoubler	}	Nitrate d'ammoniaque	8 gr.
		Glucose	50 gr.
		Citrate de soude	20 gr.
		Chlorure de sodium	20 gr.
		Constante minérale	50 gr.
		Eau, q. s. pour	500 gr.

L'ajustage se fait en prenant 50 cc³ de cette solution et en ajoutant la quantité nécessaire soit d'acide, soit d'alcali, pour obtenir le pH désiré et en complétant finalement à 50 cc³.

On a préparé ainsi toute une gamme de séries allant de pH 0,8 à pH 7,02. Les milieux ainsi préparés sont distribués aseptiquement à la dose de 25 cc³ dans des ERLIENMEYER contenant déjà les voiles solides, puis on place le tout à l'étuve à 27°. On retire les fioles au bout d'un certain temps.

On dose dans les fioles témoins et dans les milieux expérimentaux l'azote sous ses formes nitrique et ammoniacale.

Dans nos premières expériences nous allons chercher à quel pH commence l'attaque de l'ion nitrique et à quel autre débute l'attaque de l'ion ammoniacal ; ce qui nous conduit à faire des expériences de durée relativement courte.

EXPÉRIENCE N° 15.

Aspergillus repens et nitrate d'ammoniaque.

Obtention des mycelium sur milieu à la carotte. Voiles de cinq jours, ayant subi 5 lavages en 24 heures (1). Substitution avec milieu au nitrate d'ammoniaque.

On utilise 5 séries de ce milieu ajustées à différents pH.

Les 5 groupes de 2 fioles sont retirées en une seule fois au bout de 14, 30 heures de contact .

Le titrage des témoins donne les résultats suivants (tab. 23) :

(1) Voir la technique des voiles solides, page 42.

TABLEAU 23

Séries	pH	N. ammoniacal	N. nitrique
I	3.07	35	35
II	3.77	35	35
III	4.63	35	35
IV	5.45	35	35
V	5.85	35	35

Les résultats expérimentaux sont relevés dans le tableau 24.

L'attaque de l'ion nitrique commence aux pH très acides puis se ralentit beaucoup lorsque le milieu initial devient plus alcalin. On observe l'inverse pour l'ion NH_3 .

En raison du temps assez court de l'expérience, les pH ont peu varié.

TABLEAU 24

**Voiles substitués avec un milieu N/10 en NO_3NH_4
ajusté à différents pH. (Durée du contact, 14 h. 30).**

P H initial	Série	Mycélium en grammes	P H	N. ammoniacal		N. nitrique	
				résiduel	disparu	résiduel	disparu
3 07	1	a	3.12	39.56	0	31.48	3.52
		b	3.24	38.88	0	31.44	3.56
3 77	2	a	4.28	36.80	0	28.44	6.56
		b	4.28	36.96	0	28.42	6.58
4 63	3	a	4.78	31.72	3.28	27.00	8.00
		b	4.83	33.48	1.52	28.91	6.09
5.45	4	a	5.51	31.56	3.44	29.76	5.24
		b	5.52	31.80	3.20	30.52	3.48
5.85	5	a	6.43	31.96	3.04	34.56	0.44
		b	6.44	32.72	2.28	33.88	1.12

EXPÉRIENCE N° 16.

Aspergillus repens et nitrate d'ammoniaque.

Mêmes conditions expérimentales que dans l'expérience précédente. On utilise des voiles obtenus sur milieu à la carotte. Substitution après lavage par des milieux nitrates habituels ajustés à 6 pH différents.

6 séries de fioles retirées au bout de 13 heures de contact.

Le dosage des témoins est relevé sur le tableau 25 et les résultats expérimentaux sont notés au tableau 26.

Les résultats de cette expérience sont particulièrement intéressants. On y voit, là encore, l'assimilation de l'ion NO^3 commencer aux pH très acides, passer par un maximum pour décroître considérablement lorsqu'on arrive aux pH neutres ou alcalins. Inversement, en milieu très acide, l'absorption de l'ion NH^3 d'abord très faible ou même nulle, augmente d'intensité lorsqu'on gagne les régions neutres ou alcalines. Notons une véritable décharge de l'ammoniaque issue de la réduction des nitrates dans le milieu extérieur (seulement dans les premières séries, et en milieu relativement acide).

TABLEAU 25

Séries	pH	N/ NH^3	N/ NO^3
I	1.18	35	35
II	3.72	35	35
III	4.59	35	35
IV	5.35	35	35
V	6.79	33.20	35
VI	7.02	33.28	35

TABLEAU 26

**Voile substitué avec un milieu N/10 en NO_3NH_4 ,
ajusté à différents pH. (Durée du contact : 13 h.).**

P H initial	Série	Mycelium en grammes	P H	Azote ammoniacal		Azote nitrique		
				résiduel	consommé	résiduel	consommé	
1.18	1	a	0.379	1.35	37.84	0	34.96	0.04
		b	0.385	1.51	36.52	0	35.16	0
3.72	2	a	0.482	4.17	36.44	0	29.44	5.56
		b	0.478	4.07	36.64	0	31.36	3.64
4.59	3	a	0.479	4.93	37.68	0	28.20	5.80
		b	0.450	4.93	37.28	0	28.56	5.44
5.35	4	a	0.494	5.32	36.52	0	31.20	3.80
		b	0.466	5.42	35.12	0	30.44	4.56
6.79	5	a	0.423	5.97	30.40	2.80	33.48	1.52
		b	0.471	6.03	30.16	3.04	33.52	1.48
7.02	6	a	0.574	6.06	27.76	5.52	33.12	1.88
		b	0.483	6.08	28.16	5.12	33.88	1.12

Nous allons maintenant faire varier les temps de contact. Jusqu'ici, nous opérons avec des séries à différents pH que l'on laissait uniformément de 13 h. 30 à 14 h. en contact avec le mycélium. Nous allons laisser des séries ajustées au même pH en contact avec le mycélium pendant des temps différents.

EXPÉRIENCE N° 17. — MARCHE DE L'ATTAQUE EN MILIEU ACIDE.

Voiles obtenus en 5 jours sur milieu ordinaire, substitution avec milieu habituel au nitrate d'ammoniaque ajusté à pH 1,8.

6 séries de 2 fioles retirées les 16,30, 43, 64,30, 86, 110 et 131^e heures. Le titrage des témoins a donné les résultats suivants :

TABLEAU 27

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	1.89	35	35

TABLEAU 28

(Marche de l'attaque en milieu acide).

Voile substitué par un milieu N/10 en NO³NH⁴ ajusté à pH = 1,89

(6 groupes de 2 fioles retirées à des intervalles réguliers).

P H initial	Groupes	Temps en heures	Mycélium en grammes	P H	N. ammoniacal		N. nitrique		
					résiduel	consommé	résiduel	consommé	
1.89	1	a b	16.30	0.211	2.73	37.72	0	31.52	3.48
				0.216	2.65	37.96	0	30.96	4.06
1.89	2	a b	43 h.	0.256	3.46	39.20	0	23.16	11.84
				0.278	3.41	39.76	0	25.24	9.76
1.89	3	a b	64.30	0.388	3.91	32.96	2.04	15.04	19.96
				0.483	4.12	31.04	3.96	11.44	23.56
1.89	4	a b	86 h.	0.534	5.45	31.92	3.08	11.00	24.00
				0.5075	4.99	30.32	4.68	10.56	24.44
1.89	5	a b	110 h.	0.4875	8.13	30.96	4.04	10.40	24.60
				0.452	8.21	31.52	3.48	10.72	24.28
1.89	6	a b	134 h.	0.4575	8.21	33.60	2.40	10.40	24.60
				0.423	8.17	36.08	1.08	8.48	26.52

On peut diviser l'expérience en quatre parties distinctes :

1° Jusqu'à la 48^e heure consommation de NO³ et enrichissement du milieu en ammoniacque.

Le milieu s'alcalinise et le mycélium n'augmente pas de poids.

2° De la 43^e heure et jusque vers la 86^e heure, continuation de la consommation de NO^3 . Mais l'ammoniaque commence à être utilisée ; énorme augmentation de poids du mycélium qui passe brusquement de 27 ctg. à 53 ctg. Alcalinisation du milieu. Le champignon doit construire son édifice azoté en copulant N/NH^3 avec les restes carbonés issus de l'assimilation des sucres.

3° A partir de la 86^e heure le milieu se trouve dans une zone de pH telle que la cellule n'absorbe plus l'ion NO^3 et l'on va constamment retrouver la même dose de nitrate dans le milieu de culture jusqu'à la fin de l'expérience.

La synthèse potéique commence à se ralentir, vraisemblablement par suite de la disparition du sucre mis à la disposition du mycélium. La protéolyse commence alors ; elle est visible vers la 110^e heure. Le mycélium passe de 50 à 48 ctg., le milieu s'alcalinise brusquement et le pH passe de pH5 à pH8.

4° Enfin à partir de la 134 heure la protéolyse règne ; NH^3 à nouveau diffuse dans le milieu extérieur. Et ce n'est plus NH^3 issue de la réduction de NO^4 mais de l' NH^3 provenant du processus de protéolyse.

Le poids du mycélium tombe au-dessous de 45 ctg. et le pH dépasse 8,2.

EXPÉRIENCE N° 18. — MARCHE D'ATTAQUE EN MILIEU PEU ACIDE.

Voiles obtenus en 4 jours sur milieu ordinaire, substitution avec le milieu habituel au nitrate d'ammoniaque ajusté à $\text{pH} = 4,84$.

6 séries de 2 fioles retirées les 15, 38, 64, 88, 136, 204^e heures.

Titrage des témoins au tableau 29.

TABLEAU 29

Série	pH	N/NH^3	N/NO^3
2	4.84	35	35

Cette expérience nous montre (tableau 30) que la disparition de l'ion nitrique continue à ce pH. Elle atteint 10 mmgr. dès la 64^e heure et cesse à partir de la 64^e heure et la quantité retrouvée se maintient à peu près constante jusqu'à la 204^e heure.

Disparition également de l'ion ammoniacal.

On ne retrouve pas d'excès d'ion NH_3 dans le milieu de culture et le mycélium qui augmente de poids les toutes premières heures, *reste ensuite stationnaire* pour diminuer à la 136^e heure par suite de la *protéolyse*.

TABLEAU 30

MARCHE DE L'ATTAQUE EN MILIEU PEU ACIDE

Voiles substitués par un milieu N/10 en NO_3NH_4 ajusté à pH = 4,84

(6 groupes de 2 fioles retirés à des intervalles réguliers).

P H initial	Groupes	Temps en heures	Mycélium en poids	P H	N. Ammoniacal		N. Nitrique	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
4.84	1 a	15	0.179	5.04	34.96	0.04	34.	1.00
	b		0.186	5.02	34.88	0.12	34.40	0.60
4.84	2 a	38	0.277	5.02	29.84	5.16	28.88	6.12
	b		0.330	5.11	29.12	5.88	28.08	6.92
4.84	3 a	64	0.430	5.09	23.56	11.44	25.88	9.12
	b		0.386	5.02	19.68	15.32	24.48	10.52
4.84	4 a	88	0.471	7.48	17.16	17.84	23.92	11.08
	b		0.416	7.96	18.16	16.84	23.52	11.48
4.84	5 a	136	0.400	8.22	21.08	14.92	23.92	11.08
	b		0.397	8.41	21.08	14.92	24.04	10.96
4.84	6 a	204		8.87	18.56	16.44	24.	11
	b			8.98	18.88	16.12	24.32	10.68

EXPÉRIENCE N° 19. — MARCHE DE L'ATTAQUE EN MILIEU ALCALIN.

Voiles obtenus en 4 jours sur milieu à la carotte. Substitution avec le milieu nitrate habituel ajusté à pH = 0,7.

6 séries de fioles retirées les 14, 38, 62 et 92^e heures. Le titrage des témoins donne les résultats indiqués au tableau 31.

TABLEAU 31

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
3	9.72	35.7	35.7

D'après les résultats relevés sur le tableau 32, l'absorption de l'ion NO³ est nulle en milieu alcalin. Elle commence peut-être légèrement dans le groupe IV à la 92^e heure. Par contre l'absorption de NH³ est intense. Notons qu'une forte protéolyse nous fait arrêter l'expérience à la 92^e heure. Le mycélium passe de 15 ctgr. à 10 ctgr.

Acidification légère par suite de la consommation de l'ion NH³.

TABLEAU 32

MARCHE DE L'ATTAQUE EN MILIEU ALCALIN

Voiles substitués par un milieu N/10 en NO³NH⁴ ajusté à pH = 9,72

(4 groupes de 2 fioles retirés à des intervalles réguliers).

P H initial	Groupe	Temps en heures	Mycelium en grammes	P H	N / ammoniacal		N / nitrique		
					résiduel	consommé	résiduel	consommé	
9.72	1	14	a	0.151	9.53	26.96	8.74	35.40	0.30
			b	0.143	9.56	26.40	9.30	35.80	0
9.72	2	38	a	0.116	9.29	24.48	11.22	35.36	0.34
			b	0.118	9.08	17.52	18.18	35.20	0.50
9.72	3	62	a	0.127	9.15	23.92	11.78	35.80	0
			b	0.161	9.15	23.84	11.86	35.52	0.18
9.72	4	92	a	0.107	8.85	23.28	12.42	34.52	1.18
			b	0.107	8.83	22.96	12.74	35.04	0.66

DISCUSSION

Dans le chapitre précédent nous avons admis que l'on pouvait mettre en évidence la réduction de l'ion NO^3 en ammoniacque. Nous avons vu, en outre, que celle-ci ne passait dans le milieu extérieur où elle peut être dosée, que si certaines conditions étaient réalisées. Ces conditions nous paraissent liées à la constante de dissociation de l'ammoniacque et à la concentration en ion H du milieu extérieur.

Rappelons que l'ion nitrique absorbé par l'organisme est transformé par les catalyseurs cellulaires en ammoniacque ; celle-ci prend immédiatement l'état de dissociation réglé par le pH intracellulaire. Or, on sait que la dissociation électrolytique de l'ammoniacque en ion $(\text{NH}^4)^+$ et $(\text{OH})^-$ commence vers $p = 11$, augmentent constamment avec le pH pour atteindre un taux de 50 % vers $\text{pH} = 9$ et devenir presque totale vers $\text{pH} = 6,5$ environ. D'autre part, il est établi que le pH du contenu cellulaire des Moisissures et généralement compris entre 5,5 et 7.

Dans ces conditions une faible partie de l'ammoniacque issue de la réduction de l'ion nitrique prend la forme non ionisée électriquement neutre NH^4OH pour laquelle la membrane protoplasmique est très perméable.

Si le milieu extérieur est très acide, l'ammoniacque qui y arrive s'y ionise intégralement, si bien que l'ammoniacque à l'état moléculaire ne peut jamais atteindre une tension capable d'équilibrer celle, si petite soit-elle, qui existe à l'intérieur de la cellule ; au contraire, si le milieu extérieur est alcalin ou neutre l'ammoniacque qui y entre reste à l'état moléculaire et atteint presque immédiatement un taux comparable à celui qui est à l'intérieur de la cellule, de telle sorte, qu'en vertu de la loi du déplacement de l'équilibre, toute l'ammoniacque produite par la cellule peut, suivant la réaction du milieu extérieur (à condition qu'elle reste sensiblement constante pendant toute la durée de l'expérience) ou bien être conservée à la disposition de la cellule qui pourra effectuer sa synthèse protéique ou bien être déversée dans le milieu extérieur au fur et à mesure de sa formation.

Nous avons vu que ces faits se vérifient très nettement avec un milieu renfermant NO^3K .

Les résultats que nous venons d'obtenir en utilisant un milieu N/10 en nitrate d'ammoniaque entrent bien dans le cadre de nos conceptions.

De plus ils nous permettent de comprendre et d'expliquer un certain nombre de faits :

1°) Absorption de l'azote sous ses formes *nitrique et ammoniacale*.

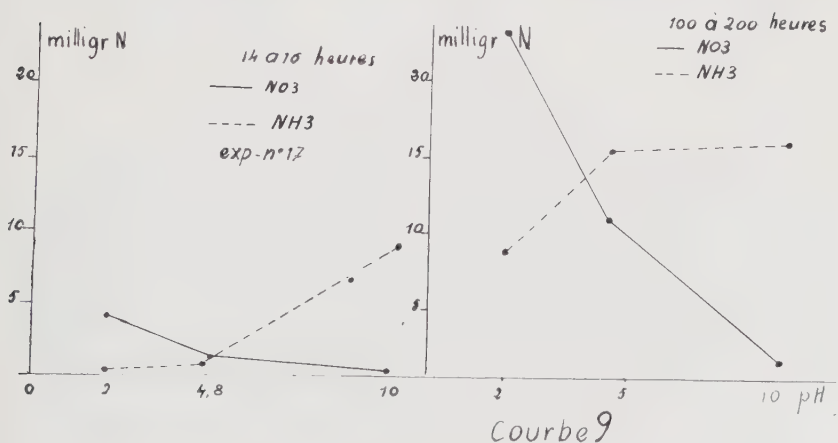
2°) Réduction de l'ion NO^3 et sort des produits de réduction.

1°) — ABSORPTION DE L'AZOTE

SOUS SES FORMES NITRIQUE ET AMMONIACALE.

Si nous représentons graphiquement les résultats obtenus avec les expériences N° 17, 18 et 19, pages 93 et 95 avec en abscisse les pH et en ordonnée les milligrammes d'azote disparus nous obtenons les 2 courbes ci-contre. (Courbe 9).

La première relève les résultats des premières heures, l'autre les résultats obtenus au bout de 100 à 200 heures de culture.



Ces deux courbes montrent nettement que *l'absorption de l'ion nitrique* est maximum du côté acide, tandis que *l'absorption de l'ion NH^3* est maximum du côté alcalin ou neutre.

Cependant il est peu probable, ainsi que le pense RIPPEL, suivant les hypothèses que nous avons exposées précédemment, que le protoplasme se comporte comme un colloïde amphotère fonctionnant comme un acide du côté alcalin et comme un alcalin dans la zone acide. On sait, en effet, que les réactions du cytoplasme en général, et de la cellule en particulier ne peut évoluer que dans d'étroites limites. Les systèmes régulateurs de la cellule leur permettent de séjourner dans un milieu ou plus acide ou plus alcalin tout en conservant invariable son pH. (1).

Il est donc peu probable qu'il y ait un déplacement du pH du protoplasme.

Nous ne reprendrons pas ici la discussion que nous avons ébauchée au chapitre précédent.

Reportons-nous aux courbes de dissociation de l'acide NO^3H et de l' NH^3 (voir page 26). Nous avons vu que d'après le calcul des restes de dissociation, l'absorption de NO^3 devait être maximum en milieu acide et l'absorption de NH^3 maximum en milieu alcalin.

Nous voyons d'après les résultats de ce chapitre que nos vues théoriques sont bien confirmées expérimentalement.

Toutefois rappelons qu'un très grand nombre d'auteurs ont obtenu des résultats du même ordre (*cf.* Historique).

2°. — RÉDUCTION DE L'ION NO^3

ET SORT DES PRODUITS DE RÉDUCTION.

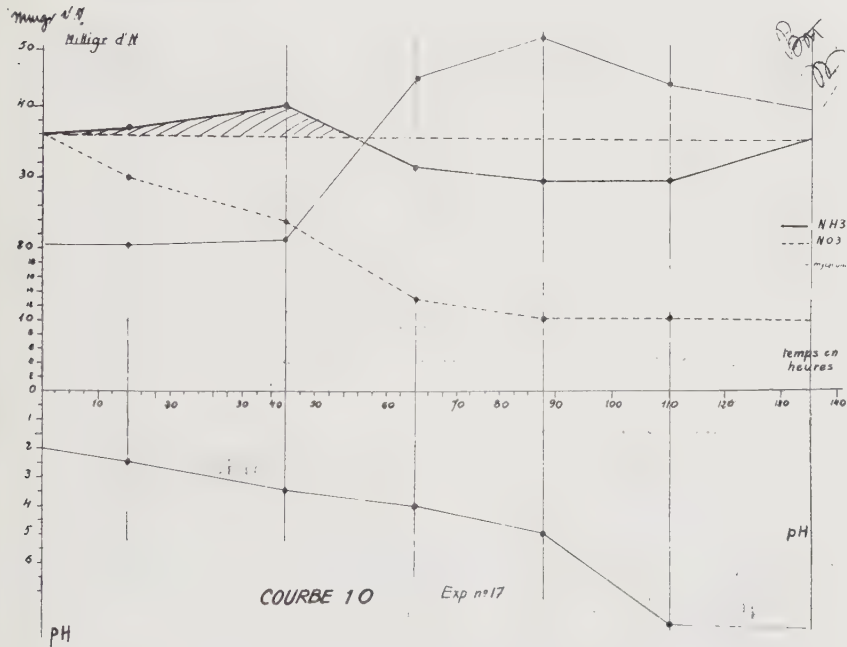
Ces faits se vérifient donc très nettement avec un milieu renfermant NO^3NH^4 . Et nous voyons qu'avec ces hypothèses on explique ce fait paradoxal: le milieu s'enrichit en ammoniacque. Le champignon placé sur la solution de nitrate d'ammoniacque très acide réduit l'azote nitrique par ses catalyseurs en ammoniacque et rejettera celle-ci dans le milieu extérieur. Et c'est pour-

(1) Pour plus de détails consulter l'ouvrage de REISS: PH intérieur cellulaire. (Presses universitaires. Paris).

quoi il s'enrichit en ammoniaque bien que sa concentration en cette substance soit bien plus grande que celle qui peut exister dans la cellule.

Mais ces résultats sont encore mieux mis en valeur si on les représente graphiquement ; on trouvera sur la courbe 10 les différentes phases de la réduction de l'ion nitrique suivant le pH.

ABSORPTION DU NITRATE D'AMMONIAQUE PAR L'ASPERGILLUS REPENS.
— RÉDUCTION ET ASSIMILATION DE LA MOLÉCULE NITRIQUE. —
ENRICHISSEMENT DU MILIEU EN AMMONIAQUE.



COURBE 10

Exp n°17

LEGENDE. — Jusque vers la 48^e heure : consommation de NO_3 et enrichissement du milieu en NH_3 (l'excès de NH_3 par rapport à l'ammoniaque initiale est achuré sur le graphique). Chute de la courbe du pH vers la zone alcaline (graphique du bas). Mycélium stationnaire.

De la 48^e heure à la 86^e environ l'ammoniaque issue de la réduction commence à être utilisé et le mycélium augmente de poids : les deux graphiques se coupent presque à angle droit.

La courbe représentative de la molécule nitrique (trait pointillé) va en s'infléchissant indiquant la consommation de NO_3 .

Enfin, à la fin de l'expérience la protéolyse s'installe : décharge ammoniacale, perte de poids du mycélium, alcalinisation.

DEUXIEME PARTIE

INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR L'ASSIMILATION DE LA MOLECULE NITRIQUE

Les différents auteurs qui ont étudié l'assimilation de l'azote par les organismes végétaux se sont presque tous occupés des différents facteurs susceptibles d'exercer une influence sur le phénomène.

Citons particulièrement les travaux de KOSTYSCHEW et TSWETKOWA (26). WARBURG et NEGELEIN (76), KLEIN, EIGNER et MULLER (23) BACH (2). T. SAKAMURA (64), et RIPPEL (55), (*cf.* Historique).

KOSTYTSCHEW publie des résultats obtenus avec des milieux avec ou sans sucre, d'autres où les temps de contact sont variables, d'autres enfin où les milieux sont de formules très différentes.

Nous avons vu précédemment que WARBURG a donné une étude très complète sur l'influence de la lumière, des narcotiques, de l'uréthane, etc...

KLEIN et ses collaborateurs étudient l'influence de la source de nitrate, celle de la source de carbone, de l'anaérobiose, des narcotiques, des cyanures, de l'urethane.

SAKAMURA note l'influence du pouvoir tampon, de la culture préalable, de la concentration du sucre dans le milieu, de la méthode d'ensemencement et surtout de la nature du sucre.

Enfin RIPPEL s'est surtout attaché à l'étude de l'influence de la concentration en ion H du milieu extérieur.

Nous avons, dans les chapitres précédents, assez insisté sur l'influence de la réaction du milieu pour ne plus y revenir ici.

Nous avons été amené, dans les chapitres qui vont suivre, à étudier les influences suivantes sur la réduction de l'ion nitrique:

1° *Influence du sucre.*

2° *Influence de la protéolyse préalable.*

3° *Influence de la dose de nitrate.*

4° *Influence de la température.*

5° *Influence de la pression osmotique.*

Ces expériences ont été faites en utilisant la méthode des voiles solides.

CHAPITRE PREMIER

INFLUENCE DU SUCRE

C'est une notion aujourd'hui classique que la réduction endothermique de l'ion nitrique est couplée avec l'oxydation des molécules sucrées.

Nous ne saurions, dans le cadre de ce travail, envisager l'étude complète de l'influence des hydrates de carbone sur la réaction de réduction des nitrates par la cellule vivante.

Nous extrayons simplement d'un travail encore en cours avec M. D. BACH les chiffres suivants.

Dans ce travail on a envisagé les influences de la dose de sucre et de la nature de l'hydrate de carbone utilisé.

Voici quelques expériences dues à M. D. BACH où l'on a recherché l'influence de la dose de glucose à pH constant (environ 2,9).

1°. — Influence de la dose du sucre

EXPÉRIENCE N° 21.

Aspergillus repens et doses croissantes de glucose.

Nous avons préparé des milieux à pH initial égal à 2,9 environ ; de formules analogues à celles utilisées jusqu'ici mais à doses variables de sucre : 0, 1, 5 et 10 %.

Nous préparons d'abord la solution mère suivante :

Constante minérale	50 cc ³
Citrate de soude	20 gr.
Chlorure de sodium	20 gr.
Nitrate de potassium	10 gr. 10
Hcl 2N	80 cc ³
Eau bidistillée, q. s. p.	500 gr.

à dédoubler

Les milieux définitifs sont alors établis d'après le tableau suivant :

TABLEAU 33

Séries	Solution mère	Glucose	Eau bidistillée
1	50	0	100
2	50	1	100
3	50	5	100
4	50	10	100

La dose de glucose ajoutée à chaque milieu a amené une légère variation du pH.

Pour 0 %		pH = 2.97
1 %		2.98
5 %		2.98
10 %		3.08

La teneur en azote nitrique est de 35,80 mmg. pour 25 cc³ de milieu.

Les voiles obtenus en suivant notre technique habituelle, après avoir été lavés, sont placés sur le liquide de substitution, puis laissés en contact de 24 à 48 heures.

Les résultats expérimentaux de ces quatre séries sont relevés dans le tableau N° 35.

1° Nous y voyons qu'en *l'absence de sucre*, la réduction du nitrate est pratiquement arrêtée. Il faut peut-être attribuer la faible réduction observée au citrate de soude. Il y a, par contre, une protéolyse marquée : nos mycéliums utilisés dans cette expérience avaient un poids moyen de 30 ctgr. et la protéolyse se traduit par une diminution de poids du mycélium (moins de 20 ctgr.) et une apparition des plus nettes d'ammoniaque.

2° Avec 1 % de glucose les chiffres bruts nous montrent que la disparition de l'azote nitrique est un peu moins intense qu'avec 5 % de sucre, de même la formation d'ammoniaque. Par contre le pourcentage de l'azote nitrique retrouvé sous

forme d'ammoniaque est très élevé. Le rendement de la réaction approche de 80 %. On peut expliquer les faits de la façon suivante :

a) La réduction de l'azote nitrique ne peut se faire qu'avec une réaction d'oxydation couplée à celle du glucose.

b) L'ammoniaque issue de cette réduction n'est engagée dans des processus de synthèse que si la formation du mycélium est active, c'est-à-dire lorsque le milieu est très favorable et riche en sucre. Mais si la dose de sucre est peu élevée, cette synthèse est peu active et la majeure partie de l'ammoniaque formée n'est pas utilisée. Il y a donc à ce point de vue un optimum.

En fait, dès la 24^e heure, le champignon a consommé tout le sucre offert si bien qu'à côté de l'ammoniaque issue de la réduction des nitrates il y a déjà de l'ammoniaque de protéolyse ; on ne peut donc tirer aucune conclusion de la série 2.

3° Avec 5 % de glucose les chiffres montrent qu'à la 24^e heure le pourcentage d'azote nitrique transformé en NH_3 par rapport à l'azote nitrique disparu est de 50 % environ. Puis à la 48^e heure, le pourcentage tombe à 25 %. Il y a consommation d'une quantité très forte de NO^3H ainsi qu'une augmentation considérable du poids du mycélium. Mais de plus le pH passe à 4,75. Le rendement de la réduction semble être en définitive fonction de deux facteurs importants :

a) pH extérieur qui règle l'état d'équilibre de NH_3 entre la cellule et le milieu.

b) Dose de sucre qui influe sur la quantité d'ammoniaque engagée dans les processus de synthèse.

4° Avec 10 % de glucose le rendement de la réaction est sensiblement plus bas, 30 % environ. La consommation de l'azote nitrique est du même ordre de grandeur, mais la quantité d'ammoniaque retrouvée est moindre. La différence doit être représentée par une plus grande intensité de synthèse.

En résumé, l'expérience précédente nous montre que la dose de 1 % de sucre était insuffisante et que la durée de 24 heures était trop longue.

Nous allons donc faire une expérience avec des doses moindres et un temps plus court.

EXPÉRIENCE N° 22.

Aspergillus repens et doses croissantes de glucose.

Même technique que dans l'expérience précédente.

On utilise des voiles solides d'*Aspergillus repens* préparés comme il a été dit. Les milieux à doses croissantes de sucre sont préparés comme suit :

On fait d'abord la solution mère suivante :

A dédoubler	Constante minérale	50 cc ³
	Nitrate de potassium	10 gr.
	Citrate de sodium	20 gr.
	HCl 2N	80 cc ³
	Chlorure de sodium	20 gr.
	Eau distillée, q. s. p.	500 gr.

Puis les solutions définitives se font suivant les indications portées sur le tableau 34.

TABLEAU 34

Titre % de glucose	1	2	3
Solution mère	50	50	50
Glucose en gr.	1,25	3,125	6,25
Eau distillée	100	100	100

La teneur en N/NO³ est de 40,40 mmgr. par 25 cc³. Les pH ont pour valeur :

1 % de glucose	pH = 3,09
2 »	3,11
5 »	3,09

Après lavage des voiles et substitution des milieux on laisse en contact à l'étuve à 29° pendant 12, 27 et 48 heures.

Les résultats notés au tableau 36 sont semblables à ceux de l'expérience précédente, et en fait la confirment. Notons cepen-

dant qu'à la 12^e heure, quelle que soit la dose de sucre le pourcentage de NO^3 utilisé reste sensiblement le même.

Conclusions sur l'influence de la dose du sucre.

Le résultat de ces expériences est très net, s'interprète facilement et complète ce que nous avons mis en évidence jusqu'ici.

Quant on fournit au mycélium NO^3H celui-ci pénètre dans le mycélium proportionnellement à la concentration des molécules non ionisées (NO^3H). On peut, alors, admettre que la cellule réduit presque instantanément NO^3H en NH^3 à condition qu'il y ait un « sucre » pour fournir l'énergie nécessaire.

Il faut donc donner une certaine quantité de sucre, or, c'est justement ce que nous prouvent les expériences précédentes.

D'ores et déjà nous pouvons dire que la destinée ultérieure de l'ammoniaque dépend de plusieurs facteurs et l'on distinguera, avec de nombreux auteurs :

1° NH^3 entraînée en synthèse.

2° NH^3 excrétée.

Et nous dirons que les divers facteurs agissant sur ces faits sont :

1° *Le pH.* Plus la concentration en ions H est élevée dans le milieu de culture plus l'ammoniaque aura tendance à passer dans ce milieu.

2° *La dose de sucre.* Si la dose est élevée, le champignon utilisera mieux NH^3 offert. Si elle est moins élevée, le rendement diminuera (voir la courbe n° 11). Si la dose est trop faible il y aura rapidement épuisement du sucre. La réduction de l'ammoniaque s'arrête (1 % de glucose) mais il continue de se former de l'ammoniaque de protéolyse.

3° *La nature du sucre* ainsi que l'a montré entre autres SAKAMURA.

4° *L'épuisement du milieu en azote.* Une véritable faim devant avoir une influence nette sur le phénomène (voir un peu plus loin, page 120).

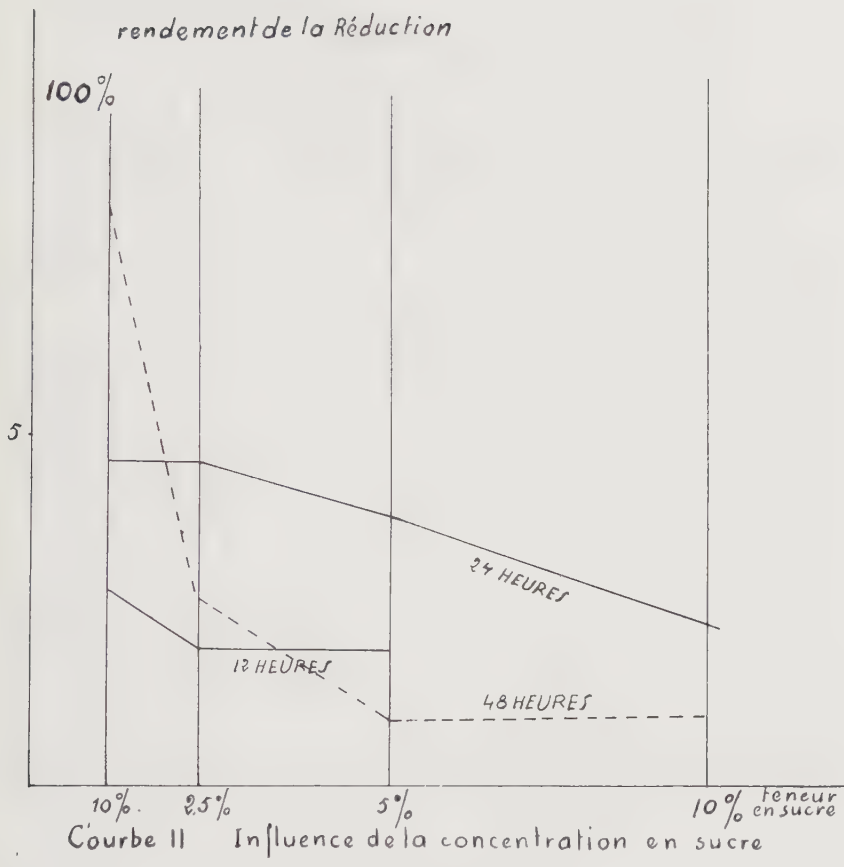


TABLEAU 35

**Voiles substitués sur milieu N/10 en NO_3K à doses variables
de glucose ajustés à un pH voisin de 3.**

Dose de sucre	1 ‰ pH initial 3,09			2,5 ‰ pH initial 3,11			5 ‰ pH initial 3,09			
Temps en heures	12	27	48	12	27	48	12	27	48	
pH	3.34 3.49	4.07 —	5.09 —	3.42 3.35	4.21 —	5.67 —	3.41 3.37	4.25 —	4.86 —	
Mycélium en grammes	0.190 0.242	0.214	0.213	0.215 0.159	0.222	0.300	0.205 0.181	0.281	0.350	
N/NH4 présent	0.64 1.60	4.68	10.88	0.84 0.48	5.84	7.76	0.84 0.72	4.48	0.64	
N/NO3	résiduel	37.24	30.72	27.84	36.40	28.36	20.16	35.72	27.52	20.32
		36.			36.80			36.72		
	disparu	3.16	9.68	12.56	4.	12.04	20.38	4.68	12.88	20.08
		4.40			3.60			3.68		
Pourcentage de N/NO3 disparu et retrouvé sous forme de NH3	20‰ 36.3‰	47.6‰ —	86.3‰ —	21‰ 13.3‰	48‰ —	38‰ —	17.9‰ 19.8‰	34.7‰ —	3.2‰ —	

TABLEAU 36

Voiles substitués sur milieu N/10 en NO³K à doses variables de glucose ajustés à un pH voisin de 3.

Dose de sucre		0 % P H initial 2.97		1 % P H initial 2.98		5 % P H initial 2.98		10 % P H initial 3.08	
Temps en heures		24	48	24	48	24	48	24	48
P H	a	3.36	3.25	3.94	4.52	3.84	4.75	3.86	4.45
	b	3.33		3.96		4.03		3.76	
Mycélium en grammes	a	0.213	0.229	0.236	0.268	0.261	0.480	0.312	0.485
	b	0.202		0.262		0.322		0.291	
N/ NH4 présent	a	3.12	3.24	2.24	8.56	0.40	6.16	2.24	2.64
	b	2.52		1.76		1.72		2.44	
N/NO3	résiduel	a	35.80	33.92	29.28	24.72	27.88	12.32	27.00
		b	35.84		23.96		27.16		28.64
	disparu	b	0.40	2.28	6.92	11.48	8.32	23.48	9.20
		a	0.36		7.24		9.04		7.56
Pourcentages d'N/NO3 réduit et re- trouvé sous forme de NH3				32.4 %	74.4 %	48.4 %	25.8 %	24.30 %	15.90 %
				24.3 %		19.11 %		32.20 %	

Conclusions générales sur le rôle et l'influence des hydrates de carbone.

KOSTYTSCHÉW avait déjà attiré l'attention sur l'influence du sucre dans la réaction de réduction des nitrates. Il arrive à cette conclusion que le manque de sucre fait arrêter la réaction au stade nitrite au lieu du stade ammoniacque.

KLEIN, EIGNER et MULLER cherchent ensuite à préciser l'action de différentes sources d'hydrate de carbone.

SAKAMURA, dans son travail de 1930, prétend que l'un des gros facteurs de l'ammoniophilie serait « la nature et la concentration du sucre » dans le milieu de culture. « Je pense, dit-il un peu plus loin, qu'il y a un rapport entre la nature du sucre et l'ammoniophilie parce que cela expliquerait les différences entre moi et TAMIYA (1927) ».

Il montre que les différences entre le glucose et le saccharose sont d'autant plus accentuées que le champignon est nettement ammoniophile. Dans une certaine mesure il lui semble que l'inversion du saccharose soit nécessaire à la manifestation de l'ammoniophilie. D'une façon générale le saccharose donne des cultures plus abondantes à CH moins élevé que le glucose. Ces différences ne se manifestent plus si on utilise NH_4Cl comme source d'azote au lieu de NO_3NH_4 . La forte acidification qui en résulte doit, pense-t-il, gêner la production d'invertine et la résorption du sucre.

L'auteur japonais montre, entre autres, que pour NH_4Cl on obtenait souvent de meilleurs résultats qu'avec NO_3NH_4 ; l'ion Cl ayant une action favorisante sur l'absorption de l'ion NH_4 . Il apparaît donc certain que l'inversion du saccharose joue un grand rôle.

Enfin SAKAMURA a comparé, dans le cas d'un organisme très ammoniophile les trois sucres : glucose, lévulose, saccharose et il montre que c'est le lévulose qui est le plus favorable au développement, ce qui pourrait expliquer les résultats du saccharose (1).

Il résulte de ses diverses observations que, dans l'utilisation du nitrate d'ammoniaque, lorsque NH_3 et NO_3 sont absorbés à peu près en quantités égales et que, par suite, l'acidité s'élève peu, le développement est aussi bon avec les divers sucres. Avec le saccharose, il y a dans ces conditions inversion

(1) Nous n'avons pas encore effectué d'expériences relatives à des sources différentes d'hydrate de carbone, néanmoins il est vraisemblable que ce facteur doit jouer un rôle important et c'est pourquoi nous reproduisons ici les vues de SAKAMURA sur ce sujet.

du biose et le lévulose formé exerce son action favorable sur l'absorption de NO_3 , ce qui explique le développement « luxuriant » de SAKAMURA dans ce cas.

Mais notons aussi que SAKAMURA a déduit de la nitrophilie observée, avec le fructose et le saccharose, que ce résultat serait lié à une réduction plus facile de l'ion nitrique, en présence de ces sucres réducteurs. Voici, du reste, les propres conclusions de SAKAMURA :

« Comme substance réductrice dans les cultures de champignon on peut penser au sucre utilisé comme source de carbone. En particulier on sait que le fructose est plus réactionnel que le glucose en divers cas. Nous arrivons à la conclusion que le lévulose comparé au glucose possède pour la réduction des nitrates une activité spéciale d'où doit dépendre indirectement l'influence favorable exercée par ce sucre sur la culture ».

Du reste, si dans nos propres expériences, nous relevons le pourcentage d'azote nitrique réduit par rapport à l'azote nitrique offert nous voyons que l'absorption de NO_3 est fonction de la dose d'hydrate de carbone.

TABLEAU 37

Disparition de l'ion NO_3 suivant une dose variable d'hydrate de carbone.

Relevé d'expériences précédentes. Les mycéliums mis en cause avaient sensiblement le même poids. A la 24^e heure ils pesaient en moyenne 0 gr. 26 et à la 48^e heure 0 gr. 30.

pH initial	Dose de Sucre	Pourcentage de NO_3 disparu		RÉFÉRENCES
		en 24 h.	en 48 h.	
2,9	0	1,1 %	6,3 %	Tableau 39 Série 1
2,9	1	19 %	31,8 %	— 39 — 2
3,0	1	23,9 %	30,9 %	— 41 — 2
3,1	2,5	30,5 %	50,3 %	— 41 — 2
2,9	5	31 %	50 %	— 41 — 3
3,0	5	24,8 %	65,9 %	— 39 — 3
3,0	10	24 %	65,5 %	— 39 — 4

CHAPITRE II

INFLUENCE DE LA PROTEOLYSE PRÉALABLE

Nous avons, dans le chapitre précédent, soulevé l'hypothèse que l'épuisement du mycélium en azote devait avoir une répercussion sur le phénomène de la réduction des nitrates.

Le problème avait été posé déjà par WARBURG qui pense que les premières quantités d'ammoniaque produites sont utilisées par la cellule pour ses synthèses, et que l'excès seul est ensuite rejeté dans le milieu extérieur. Ce qui conduit l'auteur à distinguer une période d'assimilation puis une période de réduction pure. Et il soumet cette conception à une vérification en comparant des « cellules affamées en azote » par séjour prolongé de un jour sur liquide de KNOPP sans nitrate à des cellules normales donc riches en azote. D'après ses résultats, les cellules « riches en azote » semblent rejeter à l'extérieur l' NH_3 de réduction tandis que les cellules « affamées en azote » semblent fixer cet ammoniaque puisqu'il est alors impossible de la déceler dans le milieu extérieur.

Nous avons déjà exposé notre conception du rejet de l' NH_3 dans le milieu extérieur, basée sur la concentration en ions H de ce milieu et la dissociation des molécules d' NH_3 d'une part et la différence de concentration de ces molécules de chaque côté de la paroi cellulaire, d'autre part.

Cependant, à première vue, les expériences de WARBURG semblent concluantes puisqu'il ne retrouve aucun NH_3 dans le milieu en opérant avec des cellules abandonnées plusieurs heures sur milieu sans azote. Mais dans ces expériences WARBURG n'indique pas à quel pH il opère et ne donne aucun renseignement sur le poids des cellules mises en jeu. En outre ses conclusions ne sont basées que sur une seule expérience.

Par la suite KLEIN, EIGNER et MULLER ont cultivé leur champignon pendant 6 jours sur milieu sans nitrate, afin de provoquer une véritable faim en azote. Mais ils ne dégagent pas de conclusions de leur expérience.

Enfin SAKAMURA pense que l'ammoniophilie et la nitrophilie dépendent de la durée de culture préalable avant la culture finale sur milieu nitraté.

**

Comme nous opérons avec les voiles solides, un moyen commode d'obtenir des mycéliums affamés en azote, consistera à faire durer les lavages plusieurs jours. Les mycéliums ainsi traités diminuent de poids et pigmentent fortement le liquide avec lequel on les laisse en contact pendant un temps assez long. Nous avons du reste réuni dans l'expérience suivante les observations que nous avons faites à ce sujet.

EXPÉRIENCE PRÉLIMINAIRE N° 23.

Des mycéliums sont obtenus en 8 jours sur milieu habituel à la carotte. Les uns sont recueillis sur filtre tarés, séchés et puis pesés. D'autres sont soumis à des contacts avec de l'eau bidistillée, stérile, suivant notre technique habituelle, pendant un temps variable, puis entraînés sur filtres tarés, séchés et pesés.

Les résultats indiqués sur le tableau 53 montrent une diminution de poids.

TABLEAU 38

Durée du lavage à l'eau.	Poids des mycéliums
0	0.4820
3 jours	0.2830
0	0.3000
3 heures	0.2100
24 heures	0.1820
3 jours	0.2180

Une véritable autolyse se produit donc pendant ce temps de contact avec uniquement l'eau pure. C'est pourquoi nous intitulerons ce chapitre « Influence de la protéolyse préalable ».

Pour être sûr que l'influence du pH ne troublera pas nos résultats nous avons fait pour les mycéliums abandonnés le temps le plus long (3 jours) des expériences à des pH variables.

EXPÉRIENCE N° 24. — *Influence de la protéolyse préalable.*

Des mycéliums obtenus sur milieu à la carotte sont divisés en 3 groupes en vue de lavages en des temps différents en suivant notre technique habituelle avec de l'eau distillée stérile.

Nous avons employé le milieu habituel (voir page 38).

Les solutions étaient ajustées soit à $\text{pH}=2,7$ soit à $\text{pH}=4,2$.

Les milieux ont été distribués dans des fioles d'ERLENMEYER en suivant les indications suivantes :

Groupe A. — 5 fioles ont subi 4 lavages en 3 heures suivis d'une substitution du liquide précédent ajusté à $\text{pH}=2,7$. Elles sont alors placées à l'étuve à 27° .

Groupe B. — 5 fioles ont subi 4 lavages en 24 heures. Les deux derniers étant effectués l'un à la suite de l'autre afin d'éliminer toute trace de NH_3 de protéolyse. Substitution avec le liquide nitrate ajusté à $\text{pH}=2,7$. Les fioles sont alors placées à l'étuve à 27° .

Groupe C. — 10 fioles sont soumises à 6 lavages en 3 jours. Les trois derniers lavages étant effectués l'un après l'autre afin d'éliminer toute trace de NH_3 de protéolyse.

Les fioles contenant les mycéliums sont alors divisées en deux. Une partie reçoit comme liquide de substitution la solution nitrée précédente ajustée à $\text{pH}=2,7$ (C_1). L'autre une solution ajustée à $\text{pH}=4,2$. Toutes sont placées à l'étuve à 27° (C_2).

Dans chaque série les fioles sont retirées les 6, 24 et 48^e heures. On pèse le mycélium après séchage à l'étuve, on prend le pH, et l'on dose l' N/NO_3 et N/NH_3 dans le milieu de culture.

Le titrage des témoins est relevé sur le tableau 39.

TABLEAU 39

Séries	pH	N/NO ³ en mmgr.
A	2,78	34
B	2,87	34
C	4,27	34
C ²	2,26	33,7

Les chiffres relevés sur le tableau nous montrent des résultats différents de ceux de WARBURG qui d'ailleurs s'était placé dans des conditions différentes.

1° Nous voyons que quel que soit le pH du milieu de substitution le mycélium laissé trois jours au contact de l'eau voit diminuer considérablement son pouvoir d'absorption de l'ion nitrique. La faculté d'assimiler le nitrate va en décroissant au fur et à mesure que le temps de lavage augmente. En 48 heures 25 mmgr. sont fixés dans la série A, 18 dans la série B et 7 seulement dans chacune des séries C.

2° Dans la série A tant que le pH reste dans une zone acide, l'ammoniaque formée passe du mycélium dans le milieu extérieur (près de 5 mmgr. en 24 heures pour un pH au dessous de 4). Mais dès que le milieu devient moins acide, l'ammoniaque formée reste à l'intérieur de la cellule, celle-ci peut effectuer sa synthèse protéique et le mycélium augmente de poids.

Pour un pH voisin de 5 on ne retrouve plus que 1 mmgr. de N/NH³, tandis que le mycélium, presque stationnaire de 6 à 24 heures augmente brusquement dépassant 50 ctg.

3° Dans la série B le mycélium assimile encore l'acide nitrique mais moins fortement que dans la série précédente ; ce qui amène une alcalinisation moindre du milieu. Le pH reste constamment en deçà de la limite d'utilisation des ions NH³ ainsi formés. Cette NH³ reste dans le milieu extérieur : plus de 5 milligrammes à la 48^e heure ; et le mycélium augmente peu de poids :

TABEAU 40

Voiles substitués après un temps variable de lavage par des milieux N/10 en NO³K et ajustés à deux séries de pH différents, 2,7 et 4,2.

P H initial	Séries et temps de lavage	Durée du contact	P H	Mycelium	N/NH ₃ trouvé	N/NO ₃	
						résiduel	disparu
2.78	A 3 heures	6 heures	2.8	0.210	0.56	34	0
		24 heures	3.9	0.361	4.80	22.80	11.20
			3.9	0.291	4.48	24.72	9.28
		48 heures	4.5	0.532	1.28	9.20	25.80
			4.7	0.425	1.60	11.76	22.24
		6 heures	2.8	0.182	0.84	33.36	0.64
2.87	B 24 heures	24 heures	2.7	0.250	1.60	28.48	5.52
			3	0.260	?	?	?
		48 heures	3.7	0.352	4.88	15.60	18.40
			3.6	0.284	5.28	18.56	15.44
		6 heures	4.7	0.218	0.40	33.60	0.40
		6 heures	4.7	0.218	0.40	33.60	0.40
4.27	C 1 3 jours	24 heures	4.8	0.222	0.65	32.16	1.84
			4.7	0.220	0.72	31.20	1.80
		48 heures	5.5	0.258	0.16	26.56	7.44
			5.2	0.220	0.24	27.32	6.68
		6 heures	2.4	0.283	1.04	31.70	2
		6 heures	2.4	0.283	1.04	31.70	2
2.26	C 2 3 jours	24 heures	2.1	0.256	0.64	29.60	4.10
			2.4	0.220	1.60	31.60	2.10
		48 heures	2.6	0.324	2.64	27.17	6.00
			3.00	0.346	3.12	26.36	7.34
		6 heures	2.4	0.283	1.04	31.70	2
		6 heures	2.4	0.283	1.04	31.70	2

20 ctgr. à la 48^e heure contre 50 dans la série précédente.

Dans les deux séries C_1 et C_2 le mycélium assimile à peu près la même quantité d' N/NO^3 . Les variations de pH que nous pouvions faire entre les deux séries étaient forcément faibles puisque tout en cherchant à obtenir un pH le moins acide possible, il nous fallait rester dans une limite permettant au mycélium de fixer assez facilement l'ion NO^3 .
Il faut rester dans une limite permettant au mycélium de fixer assez facilement l'ion NO^3 .

3° Dans la série *la moins acide* C_1 le pH atteint rapidement la zone où l' N/NH^3 reste à la disposition du mycélium et on ne trouve plus dans le milieu extérieur que des traces d' NH^3 toujours inférieures à un milligramme. Cependant le mycélium ayant souffert d'une longue inanition de 3 jours n'augmente guère de poids.

4° Dans la série *la plus acide* C_2 d'un pH probablement voisin de celui qu'employait WARBURG, le mycélium semble fixer très rapidement l' N/NO^3 puisqu'à la 6^e heure il a assimilé 2 mmgr. d'azote nitrique alors que dans les séries précédentes on n'observait qu'une disparition nulle ou inférieure au milligramme d' N/NO^3 . Cependant cette assimilation rapide s'arrête bientôt et le mycélium se conduit comme dans les autres séries.

La culture se trouvant dans une zone où l'ammoniaque, aussitôt formée passe dans le milieu extérieur on retrouve celle-ci en assez grande quantité dans le milieu extérieur : plus de 3 mmgr. à la 48^e heure : dose en rapport avec la faible quantité de nitrate assimilée (7 mmgr.). Le mycélium reste à un poids voisin de 30 ctg.

CONCLUSIONS

De ces résultats nous ne pouvons guère conclure, comme WARBURG, qu'une cellule, privée d'azote, garde à sa disposition toute l'ammoniaque issue de la réduction nitrique, lorsqu'après son jeûne on lui offre un milieu nitraté.

Une fois de plus nous dirons que l'ammoniaque, issue de la

réduction de la molécule nitrique ne reste à la disposition de la cellule que si le pH du milieu extérieur le lui permet.

L'aspect macroscopique des cultures au cours des lavages, puis au cours du temps passé sur les milieux nitrates permet de se rendre compte d'altérations cellulaires.

Le tableau suivant résume les faits observés.

TABLEAU 41

Série A.	En culture sur carotte	mycélium bleu vert, épais moyen ¹ .
	Au bout de 3 heures	
	de lavage	<i>idem.</i> <i>idem.</i>
	Après 6 heures sur milieu nitraté	<i>idem.</i> peu épais.
	Après 24 heures, <i>id.</i> ...	<i>idem.</i> <i>idem.</i>
	— 48 — ..	mycélium épais, vigoureux, bleu vert, la partie en contact avec le liquide est grisâtre.
Série B	En culture sur carotte	mycélium bleu vert, moyen ¹ épais
	Au bout de 24 heures	
	de lavage	— vert jaunâtre aminci.
	Après 6 h. de contact.	— — —
	— 24 —	— vert jaunâtre, aspect fragile, dessous blanchâtre.
	— 48 —	mycélium jaune vert, très aminci, la partie en contact avec le liquide de culture est blanche.
Série C ₁	En culture sur carotte.	mycélium bleu vert, moyen ¹ épais
	Au bout de 3 jours de lavage	— jaunâtre, d'aspect souffreteux, ridé, mince.
	Après 6 h. de contact.	mycélium <i>idem.</i>
	— 24 —	— <i>idem.</i>
	— 48 —	— jaunâtre, fragile, extrêmement mince, des parties se détachent par place et flottent entre deux eaux.
Série C ₂	En culture sur carotte.	mycélium épais, verdâtre.
	Au bout de 3 jours de lavage	— vert jaune, ridé, aminci
	Après 6 h. de contact.	— — —
	— 24 —	— — —
	— 48 —	— assez frêle, blanc en dessous.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE LA DOSE DE NITRATE

Nous avons indiqué précédemment tout l'intérêt que présente l'étude de l'épuisement du mycélium en azote. Le rôle de la dose de nitrate offerte au champignon mérite d'être nettement défini.

Nous avons fait les expériences suivantes :

EXPÉRIENCE N° 25.

Aspergillus repens et doses croissantes de nitrates.

Nous avons préparé les milieux suivants de concentration différente et respectivement égale à N/30, N/10 et N/2 en NO^3K .

La solution mère a pour formule :

A dédoubler	{	Constante minérale	50 cc ³
		Glucose	50 gr.
		HCl 2N	100 cc ³
		Citrate de sodium	20 gr.
		Chlorure de sodium	20 gr.
		Eau bidistillée, q. s. p.	500 gr.

Les milieux sont finalement préparés en suivant les indications du tableau 42.

TABLEAU 42

	$\text{NO}^3 \text{ N}/50$	$\text{NO}^3\text{K N}/10$	$\text{NO}^3\text{K N}/2$
Solution	50	50	50
NO^3K	0.244	1.2625	6.3125
Eau, q. s. p.	125	125	125

Le dosage des témoins est relevé sur le tableau 43.

TABLEAU 43

Solution N°	pH	NO ³
1 = N/50	3,17	7.40
2 = N/10	3.25	35.80
3 = N2	3.44	180.50

Nous avons utilisé la méthode des voiles solides. Les mycéliums obtenus sur milieu habituel à la carotte sont, après lavage, placés sur les solutions dont nous venons de donner la formule.

Les fioles sont alors mises à l'étuve et dans chacune des séries on en retire deux au bout de 24 heures et 48 heures.

Les résultats sont exposés dans le tableau ci-dessous (44).

TABLEAU 44

**Voiles substitués avec des solutions à doses différentes
de nitrate de potassium ajustés à pH = 3.**

P H initial	Dose de nitrate	Temps en heures	Mycelium en grammes	P H	Azote ammo- niacal	Azote nitrique	
						résiduel	disparu
3,1	série 1	24	a	0 250	3.27	0.96	5.68
			b	0.278	3 29	0.68	4.00
	N/50	48	a	0.305	3.52	0.30	2.46
			b	0.260	3 53	0.32	1.86
3,2	série 2	24	a	0.236	3.80	4.88	28.52
			b	0.243	3.77	5.40	28.32
	N/10	48	a	0.306	4.95	7.96	19.2
			b	0.363	5.23	7.32	18.90
3,4	série 3	24	a	0.241	3 48	3.88	177.60
			b	0.239	3.49	4.00	176.60
	N/2	48	a	0.250	4.03	6.48	170.4
			b	0.236	4.01	6.48	170.

On peut conclure de l'examen de ce tableau que dans la série 1 où la quantité de nitrate offerte est de l'ordre de 7 mmgr. les mycéliums fixent une bonne partie de l'ion nitrique : 5 mmgr. en 48 heures. La quantité d' NH^3 apparue dans le milieu est très faible, le pH reste stationnaire et le mycélium n'augmente guère de poids.

Dans la série 2 les conditions sont semblables à celles de toutes les expériences que nous venons de faire jusqu'ici. On offre 35 mmgr. d' N/NO^3 et près de 17 sont fixés en 48 heures. Le pH reste à la limite d'assimilation de l'ion NH^3 formé par réduction du nitrate et l'on retrouve ensuite cette ammoniacque dans le milieu extérieur (7 milligrammes). Le mycélium augmente de poids.

Dans la série 3 on constate que le mycélium n'augmente pas de poids et que le pH devient moins acide par suite de la production d' NH^3 de réduction.

EXPÉRIENCE N° 26.

Aspergillus repens et doses différentes de nitrates.

Expérience semblable à la première mais avec des doses différentes de nitrates qui sont respectivement de N/5, N/10, N/20.

Les milieux sont préparés comme suit :

On fait d'abord deux solutions, A et B.

Solution A	Constante minérale	62 gr. 50
	NaCl	25 gr.
	HCl 2N	112 cc ³ 50
Solution B	Eau bidistillée, q. s. p.	250 gr.
	NO^3K	15 gr. 781
	Eau	250 gr.

Les milieux sont finalement faits en utilisant les indications portées sur le tableau 45.

TABLEAU 45

	1	2	3
Solution A	25	25	25
Solution B (NO ³ K)	40	20	10
Glucose	6,25	6.25	6,25
Citrate de soude 10 %	25	25	25
Eau, q. s. p.	125	125	125

Les témoins ont donné les résultats portés au tableau 46.

TABLEAU 46

Milieux		pH	NO ³
1	N/5 en NO ³ K	2.56	72
2	N/10 »	2.77	35.80
3	N/20 »	2.85	18.20

Les résultats expérimentaux relevés au tableau 47 sont comparables à ceux de la série précédente.

TABLEAU 47

Voiles substitués avec des solutions à doses différentes de NO³K ajustés à un pH voisin de 2,5.

P H initial	Dose de nitrate	Temps en heures	Mycélium en grammes	P H	Azote ammoniacal	Azote nitrique		
						résiduel	utilisé	
2.5	Série 1	24	a	0.155	2.98	2.24	67.12	4.88
			b	0.201	3.56	3.92	66.04	5.96
	N/5	48	a	0.190	3.93	8.125	62.24	9.76
			b	0.209	3.91	8.08	62.40	9.60
2.7	Série 2	24	a	0.195	3.72	4.08	31.28	4.52
			b	0.209	3.77	3.70	32.40	3.40
	N/10	48	a	0.205	4.61	12.32	21.24	14.56
			b	0.153	3.40	3.84	30.68	5.22
2.8	Série 3	24	a	0.224	3.64	3.48	14.36	3.34
			b	0.195	3.62	3.64	14.60	3.60
	N/20	48	a	0.157	3.62	4.08	13.52	4.68
			b	0.239	4.4	7.52	7.96	10.24

CONCLUSION

Dans ces expériences, faites avec des doses croissantes de nitrate qui varient entre 7 milligrammes et près de 2 centigrammes (de N/50 à N/2) et à un pH à peu près constant (pH2 à pH4), si nous exprimons la valeur alimentaire de la source azotée par le rapport entre l'azote nitrique offert et l'azote nitrique disparu, nous voyons que ce rendement, *tout au moins dans les 48 premières heures*, est inversement proportionnel à la dose offerte.

Nitrate offert env. N/50 — NO3 initial : 7 ^{mmg.} 30 — Nitrate disparu : 5,26 — Rment 70°/o									
»	»	N/20 —	»	»	18	»	20 —	»	» 7,46 — R » 55°/o
»	»	N/10 —	»	»	35	»	80 —	»	» 9,89 — R » 40°/o
»	»	N/5 —	»	»	72	»	00 —	»	» 9,68 — R » 14°/o
»	»	N/2 —	»	»	180	»	50 —	»	» 13,30 — R » 8°/o

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

L'influence de la température n'a été examinée que par fort peu d'auteurs. SHNUCK et BALABUKHA (70) en voulant établir que la réduction des nitrates par les racines des plantes était faite par des microorganismes, ont établi que la température optima du phénomène était de 38-39° et qu'un chauffage préliminaire des plantes mises en expérience retardait ou même supprimait la réaction.

EXPÉRIENCE N° 27. — *Culture en milieu nitraté à 17°.*

Nous avons utilisé également la méthode des voiles solides. Nos mycéliums étaient obtenus sur milieu à la carotte. La substitution s'opérait dans nos conditions habituelles.

Nous avons utilisé comme nouveau liquide notre milieu nitraté ordinaire ajusté à $\text{pH} = 2,30$.

Constante minérale	50 cc ³
NO ³ K	10 gr. 10
HCl 2N	50 cc ³
Citrate de sodium	20 gr.
Chlorure de sodium	20 gr.
Glucose	50 gr.
Eau bidistillée, q. s. p.	1.000 gr.

Le dosage des solutions témoins a donné les résultats suivants :

$$\begin{aligned}\text{pH} &= 2,36 \\ \text{N/NO}^3 &= 36,10 \text{ milligrammes.}\end{aligned}$$

Dans une première série d'expériences les fioles ainsi pré-

parées furent abandonnées à la température du laboratoire, soit 17°, puis retirées 2 par 2 au bout des 24^e et 48^e heures.

Les résultats du tableau 58 montrent qu'au bout de 24 heures les quantités d' N/NO_3 consommées étaient assez faibles.

Légère alcalinisation du milieu. Les mycéliums augmentent de poids.

EXPÉRIENCE N° 28. — *Culture en milieu nitraté à 27°.*

Même milieu et même technique que dans l'expérience précédente. Les fioles sont toutefois placées à l'étuve réglée à 27°.

Les résultats, relevés sur le tableau 48 permettent de voir qu'à cette température la réduction de l'ion nitrique est parfait-

TABLEAU 48

Milieu N/10 en NO_3K ; voiles substitués, les cultures sont placées à des températures différentes : 17°, 27° et 37°.

pH initial	Série	Tempér.	Temps en heures	Mycélium en grammes	P H	N/NH ₃	N/NO ₃	
							résiduel	disparu
2.30	1	17°	24	0.1665	2.68	1.80	34.24	1.86
				0.1610	2.68	2	34.40	1.70
		17°	48	0.1900	3.14	4.48	27.88	8.22
				0.1585	3.12	3.80	30.16	5.94
2.30	2	27°	24	0.1785	3.22	5.28	28.96	7.10
				0.11770	3.16	4.44	30.08	6
		27°	48	0.1920	3.78	10.08	17.96	18.14
				0.250	3.77	9.28	24.00	12.10
2.30	3	37°	24	0.1560	2.64	0.96	34.92	1.18
				0.1500	2.65	0.88	34.56	1.54
		37°	48	0.1450	2.61	0.72	33.76	2.34
				0.1500	2.62	0.76	34.96	1.14

tement effectuée par le mycélium d'*Aspergillus repens*, puisque 7 mmgr. sont utilisés dès la 24^e heure et plus de 18 au bout de 48 heures. Il y a production d' N/NH^3 qui passe dans le milieu extérieur ainsi que nous l'avons établi précédemment. Près de 10 milligrammes au bout de 48 heures pour un pH voisin de 4. Les mycéliums prolifèrent avec un gain de plus de 8 ctgr. entre la 24^e et la 48^e heure. Alcalinisation du milieu par suite de l'utilisation de l'ion NO^3 .

EXPÉRIENCE N^o 29. — *Culture en milieu nitraté à 37°*

Même milieu et même technique ; mais les fioles sont placées dans une étuve réglée à 37°. Les résultats inscrits au tableau N^o 48 montrent que la réduction est pratiquement arrêtée à cette température. Le mycélium ne fixe que 2 mmgr. de N/NO^3 à la 48^e heure.

Le pH reste stationnaire et le mycélium n'augmente pas de poids.

CONCLUSIONS

Quoique nous n'ayons pas déterminé la courbe de croissance de l'*Aspergillus repens* en fonction de la température, on peut, cependant, noter que l'optimum de la réduction est à 27°.

CHAPITRE V

INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE

Il est de notion courante, depuis KLEBS et MANGIN, que l'*Aspergillus repens* exige l'emploi de solution à forte concentration en sel marin pour donner des cultures normales.

KLEBS (21) avait signalé depuis longtemps la nécessité de cultiver l'*Aspergillus repens* sur des solutions à haute pression osmotique. Ainsi sur des milieux renfermant des doses croissantes de glucose (de 0 à 20 %) le champignon ne donne des cultures normales que sur les milieux à 20 % de sucre ; à 0,2 % il n'y a qu'un mycélium rudimentaire. De plus avec des sels minéraux variés non seulement on peut observer les mêmes faits mais on peut réaliser avec ces corps des milieux à pression osmotique suffisamment élevée pour arrêter tout développement. En 1909 MANGIN (37) a noté également la nécessité absolue d'employer des milieux très concentrés. D. BACH (1925) (2) a insisté d'une façon toute particulière sur l'influence de la pression osmotique sur la croissance de l'*Aspergillus repens* avec divers milieux liquides. La source d'azote a été, suivant les cas, soit le nitrate de potasse, soit l'asparagine, soit le succinate d'ammoniaque. Il a noté en l'absence de sel marin que la culture est réduite à des îlots blancs, puis jaune sale, qui s'immergent dans le liquide et ne présentent généralement pas d'appareils reproducteurs. Avec 1 et 2 % de NaCl, la culture est lente à partir, mais finit par donner un développement intense de pigments solubles.

Avec 5 % de sel, la culture est très rapide ; le voile blanc organisé dès le 3^e jour, devient bientôt jaune d'or et ne se couvre de conidies vertes que lorsque l'on revient dans la zone neutre pour pH = 6. Avec des concentrations plus fortes, la culture est plus lente à évoluer mais elle finit par donner des résul-

tats plus élevés. Le voile d'abord d'un blanc pur, se couvre ensuite de conidies vertes et ne jaunit que tardivement. La sécrétion des pigments solubles est presque entièrement suspendue et les milieux restent indéfiniment incolores.

Enfin D. BACH signale qu'il ne lui semble pas que la pression osmotique ait une influence marquée sur la variation de la réaction.

Il ne s'est pas attaché à étudier l'influence de cette pression sur l'assimilation de l'ion nitrique, toutefois il a présenté des résultats avec un milieu au NO^3K (1,01 %) à $\text{pH} = 3,6$. Mais il n'a pas dosé l'azote nitrique au cours de sa culture.

Cependant il a noté une légère alcalinisation de son milieu qui passe de $\text{pH} = 3,6$ à 5,5 en 20 heures, quelle qu'en soit la concentration saline, ce qui dénote une légère attaque de l'ion NO^3 .

**

Il nous a paru intéressant de reprendre l'étude de cette influence sur la réduction de l'ion nitrique à l'aide de la méthode des voiles solides.

Nous préparons deux séries de milieux obtenus de la façon suivante :

Nous partons de la solution mère suivante :

Constante minérale	12 gr. 50
Glucose	12 gr. 50
Citrate de soude	5 gr.
Solution de NO^3K N/5	40 cc ³
HCl 2N	20 cc ³
Eau bidistillée, q. s. p.	200 gr.

et nous préparons deux milieux l'un à 2 % de NaCl (milieu normal) et l'autre privé de NaCl en utilisant les indications du tableau 49.

TABLEAU 49

	Milieux	
	A	B
Solution	100 cc.	100 cc.
NaCl	2,50	0
Eau q. s.	125	125

Les voiles obtenus sur milieu habituel à la carotte sont, après lavage et suivant notre technique, placés sur les milieux A et B.

Après avoir mis les fioles à l'étuve on les retire 2 par 2 les 24^e et 48^e heures.

EXPÉRIENCE N° 30.

Aspergillus repens et milieu à NaCl = 2 %.

Les dosages des témoins ont donné les résultats suivants :

TABLEAU 50

Série	pH	N/NO ³	Poids moyen des mycéliums initiaux
A	1,61	35	0.2585
B	1,70	35	0.2585

Nous avons opéré en série acide, dans une zone où nous avons montré que la réduction de l'ion nitrique est nettement effectué par le mycélium de l'*Aspergillus repens*.

Les résultats sont relevés au tableau 51. Comme nous nous y attendions l'ion nitrique est attaqué. Le milieu devient moins acide par suite de la disparition de l'acide et l'apparition d'ammoniaque dans le milieu extérieur.

Opérant en milieu acide l'ammoniaque provenant de la réduction passe intégralement dans le milieu extérieur, et l'on retrouve 4 milligrammes à la 48^e heure ; par suite le mycélium n'ayant pas d'azote à sa disposition pour effectuer sa synthèse protéique n'augmente pas de poids.

En 48 heures 8 mmgr. d'N/NO³ sont absorbés et réduits,

TABLEAU 51

**Veilles substitués sur milieux N/10 en azote ajusté à pH = 1,6,
les uns sans NaCl, les autres avec NaCl.**

P H initial	Série	Temps de contact	pH	Mycelium	N/NH3 formé	N/NO3	
						résiduel	utilisé
1 61	A avec NaCl	24 h.	2.65	0.249	1.20	30.50	4.04
			2.07	0.279	1 28	31.20	3.80
		48 h.	2.46	0.2780	4.04	26.64	9.36
			2.54	0.2530	4.01	27.96	7.04
1.70	B sans NaCl	24 h.	2.30	0.2878	1.92	29.60	5.40
			2.12	0.2500	1.52	30.32	4.68
		48 h.	2.99	0.2850	7.45	24.88	10.12
			2.46	0.2835	4 00	28 24	6.76

EXPÉRIENCE N° 31.

Aspergillus repens et milieu ordinaire sans sel.

Même technique et mêmes témoins que dans l'expérience précédente.

D'après les résultats inscrits au tableau 51 nous voyons que le mycélium a réduit aussi bien et sinon mieux que dans la série précédente le nitrate puisque 18 mmgr. sont absorbés en 48 heures.

Le mycélium n'a guère proliféré entre les 24 et 48^e heures. L'alcalinisation du milieu semble plus forte que dans la série précédente passant de pH = 1,7 à 2,9 et semblant lié à une assez forte dose d'ammoniaque retrouvée dans le milieu extérieur ; plus de 7 milligrammes à la 48^e heure. Ceci n'a, du reste, rien d'étonnant puisque dans cette zone acide, l' NH_3 de réduction passe aussitôt formée dans le milieu extérieur.

Dans une autre série d'expériences nous avons utilisé la méthode de culture directe et opéré sur des milieux au nitrate

de potasse à concentration variable en NaCl nous avons fait un essai de plus longue durée que les précédents.

EXPÉRIENCE N° 32. — *Culture directe d'Aspergillus repens et concentrations différentes de NaCl.*

Nous avons préparé les milieux suivants comportant 3 doses différentes de NaCl 0 %, 2 % et 10 %.

Constante minérale	50 cc ³	50 cc ³	50 cc ³
NaCl	0	20 gr.	100 gr.
Citrate de soude	20 gr.	20 gr.	20 gr.
Glucose	50 gr.	50 gr.	50 gr.
NO ³ K	10,1	10,1	10,1
HCl. 2N	100 cc ³	100 cc ³	100 cc ³
Eau bidistillée, q. s. p.	1.000 gr.	1.000 gr.	1.000 gr.

On a réparti en Erlenmeyer de 125 à la dose de 25 cc³ par fiole et l'on stérilise à 115° pendant 20 minutes.

Les trois milieux sontensemencés et placés à l'étuve à 27°.

Les 8^e et 12^e jours on retire les fioles 2 par 2 dans chaque série. Le titrage des témoins a montré la présence de 35 mmgr. d'N/NO³ par fiole, les pH étant respectivement de :

Série 1 pH = 2,9. Série 2 pH = 3. Série 3 pH = 3.20

TABLEAU 52

**Culture directe sur milieu N/10 en NO³K ajustés à pH = 3
à doses variables de chlorure de sodium.**

P H initial	Dose de NaCl	Temps jours	pH	Mycélium	N/NH ₃ formé	N/NO ₃	
						résiduel	utilisé
2.9	Série 1 0 ‰	8	6.05	0.025	0.02	33	2.00
			6.30	0.050	0.10	33.05	1.95
		12	5.90	0.060	0.60	26.40	8.60
			5.12	0.070	0.95	25.90	9.10
3	Série 2 2 ‰	8	6	0.093	0.63	26.95	8.05
			5.66	0.063	0.95	30.05	4.95
		12	5.41	0.135	2.00	14.05	20.95
			5.63	0.137	3.10	17.20	17.80
3.2	Série 3 10 ‰	8	5.92	0.150	1.00	29	6.00
			6.20	0.098	0.80	27.05	7.95
		12	6.51	0.250	1.20	15.96	19.10
			5.90	0.190	2.00	18.80	16.20

Dans cette expérience nous remarquons, dans les trois séries, qu'il y a une assez forte alcalinisation qui tend vers pH = 6 et une consommation de l'ion NO³. Cependant, on voit quelques différences.

1° Dans la série 1 (sans NaCl) le champignon n'a poussé que difficilement ; le mycélium au bout du 12^e jour n'a pas l'aspect florissant qu'il présente dans les autres séries. L'assimilation de l'ion NO³ est donc moins nette que dans les autres cas ; cependant cette moindre consommation paraît devoir être attribuée au mycélium plus faible que dans les autres séries.

2° Dans les séries 2 et 3 (2 et 10 ‰ de NaCl) le mycélium est parti plus rapidement et il atteint près de 20 ctgr. en 12 jours.

L'assimilation de l'ion NO^3 est très nette et ne semble pas présenter de différences entre les deux séries. Nous sommes dans une zone de pH où la réduction de l'ion NO^3 se fait facilement et où l'ammoniaque formée ne reste pas dans le milieu extérieur et sert à la synthèse azotée.

Le phénomène est bien marqué dans ces trois séries.

Conclusion sur l'influence de la pression osmotique.

On peut conclure que la pression osmotique n'a guère d'influence sur la réaction de réduction de l'ion NO^3 .

Comme KLEBS, comme MANGIN, comme D. BACH, nous avons constaté en culture directe qu'une forte pression osmotique était favorable à la croissance du mycélium.

Cette différence d'action sur la croissance et l'assimilation des nitrates est particulièrement mis en évidence dans la série faite en utilisant la technique des voiles solides. Là, le mycélium a déjà atteint un certain poids et, le fait d'être ou de ne pas être sur milieu à forte pression osmotique n'influera pas sur la croissance du champignon déjà effectué sur le premier milieu. Et dans ce cas on n'observe aucune différence d'assimilation de l'ion NO^3 même au bout de 48 heures.

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ASSIMILATION DE LA MOLÉCULE NITRIQUE PAR DIFFÉRENTS ORGANISMES INFÉRIEURS

Nous venons de montrer que l'*Aspergillus repens* était capable d'assimiler la molécule nitrique, et même de la réduire en NH_3 qui peut être retrouvé à l'extérieur de la cellule si la réaction du milieu le permet.

Dans cette troisième partie nous nous sommes attachés à vérifier les comportements de différents champignons inférieurs vis-à-vis des nitrates et nous avons cherché à préciser entre quelles limites de pH le phénomène avait lieu.

Depuis les travaux de LAURENT (28 à 31) et ceux de RITTER (56 à 59) sur les champignons nitrophiles et ammoniophiles, bien des études ont été publiées. Citons parmi tant d'autres les publications de RACIBORSKI (54) sur l'*Aspergillus niger*, de BRENNER (15) sur l'*Aspergillus niger* également, de TAMIYA (71) (1927) et de SAKAMURA (68) sur l'*Aspergillus oryzae* ; de KLEIN et ses élèves (23) (1926) sur l'*Aspergillus niger* et *Mucor racemosus* ; de D. BACH (1925) (2) sur l'*Aspergillus repens* ; et de KLOTZ (24) (1923) sur l'*Aspergillus niger* ; de COUPIN (18) (1927) sur le *Penicillium glaucum*.

Nous avons étudié dans les chapitres suivants l'assimilation des ions NO_3^- et NH_3 par diverses Moisissures en utilisant le nitrate d'ammoniaque comme source azotée. Les espèces examinées furent les suivantes :

1° — PHYCOMYCÈTES.

- Mucorinées*. Genre *Mucor* : *M. circinelloïdes*.
 M. corymbifèr.
 M. Boulardii.
 M. Guillermondi.
 M. Prainii.
 M. racemosus.
 M. spinosus.
Genre *Rhizopus* : *R. nigricans*.
 R. reflexus.
Genre *Absidia* : *A. racemosa*.
 A. dubia.
Genre *Cunninghamella* :
 C. echinulata.
Genre *Circinella* : *C. spinosa*.
Genre *Glomerula* : *G. repens*.

2° — ASCOMYCÈTES.

- Perisporiacées*. Genre *Aspergillus* : *A. repens* (déjà vu)
 A. niger.
 A. nidulens.
Genre *Sterigmatocystis* :
 S. butyracea.
Genre *Penicilium* : *P. clavatum*.
 P. glaucum.
Genre *Botrytis* : *B. cineria*.

3° — HYPHOMYCÈTES.

- Fusarium roseum*.
Aternaria Solani.
Dematium pullulans.
-

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DE QUELQUES MUCORINÉES

Dans tous les cas nous avons utilisé la méthode de culture directe avec NO^3NH^4 comme source d'azote. Nous opérons généralement en faisant 3 séries ajustées à des pH différents.

Nous avons d'abord préparé la solution mère suivante :

A dédoubler.	}	Nitrate d'ammoniaque recristallisé.	8 gr.
		Citrate de soude recristallisé	20 gr.
		Chlorure de sodium.	20 gr.
		Glucose pur	50 gr.
		Constante minérale	50 gr.
		Eau bidistillée	500 gr.

Nous avons ensuite ajusté ce milieu à 3 séries de pH différents, à l'aide soit de la soude N/10 soit de l'acide chlorhydrique N en suivant les indications suivantes :

Milieu N° 1.

Solution mère	110 cc ³
HCl N	24 cc ³
Eau bidistillée, q. s. p.	220 gr.

Milieu N° 2.

Solution mère	110 cc ³
HCl N	10 cc ³
Eau bidistillée, q. s. p.	220 gr.

Milieu N° 3.

Solution mère	110 cc ³
NaOH N/10	5 cc ³
Eau bidistillée, q. s. p.	220 gr.

Nous obtenons ainsi 3 séries de milieux différents, les deux premiers correspondant à la zone acide, le troisième étant voisin de la neutralité (1). Les liquides ont été répartis à la pipette dans des fioles d'ERLENMEYER à raison de 25 cc³ par fiole que l'on stérilise.

On ensemence largement à l'aide d'une émulsion de spores. On porte à l'étuve une série de fioles pour chaque pH et on retire les fioles à intervalles réguliers.

EXPÉRIENCE N° 33. — MUCOR CIRCINELLOIDES.

Milieu habituel au NO³NH⁴. On utilise trois séries ajustées à différents pH. Le dosage d'un fiole témoin a donné les résultats portés au tableau 53.

TABLEAU 53

Série	N. ammoniacal	N. nitrique	pH
1	35	35	3,22
2	35	35	5,19
3	35	35	6,83

On retire les fioles les 4^e, 7^e et 14^e jours.

Les résultats consignés au tableau 54 montrent que le *Mucor circinelloides* n'a pas poussé très vigoureusement sur ce milieu nitraté puisque la récolte fut nulle presque jusqu'au 14^e jours dans la série 1 et très faible dans les deux autres. Par ailleurs, le mycélium a gardé un poids stationnaire entre le 7^e et le 14^e jour. Il a utilisé l'azote ammoniacal dans les trois séries, mais n'a pas consommé N/NO³K dans la série la plus acide, se contentant de l'attaquer faiblement dans les autres séries. La disparition de NO³ est surtout nette dans la série 2.

A une forte acidification a succédé une stabilisation les 7^e et 14^e jours.

(1) On a pris chaque fois le pH après la stérilisation afin d'éviter aux erreurs dues aux variations de la réaction du milieu après passage à l'autoclave.

TABLEAU 54

Culture directe de *M. Circinelloïdes* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajusté à 3 pH différents.

p H initial	séries	jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.22	1	4	points bl.	2.33				
		7	0.025	2.18	27.64	7.36	34.64	0.36
		14	0.052	2.72	27.64	7.36	34.92	0.08
5.10	2	4	0.092	3.64	20.60	14.40	33.12	1.88
		7	0.141	3.38	13.04	21.96	34.88	1.12
		14	0.1275	4.61	18.16	16.84	34.60	0.60
6.83	3	4	0.088	4.48	16.84	18.16	34.72	0.28
		7	0.128	4.52	10.96	24.06	33.84	1.16
		14	0.129	5.81	12.68	22.52	35.52	0

EXPÉRIENCE N° 34. — *MUCOR CORYMBIFER*.

Milieu habituel au NO^3NH^4 , ajusté à 3 pH différents.

Les dosages des témoins sont relevés au tableau 55.

TABLEAU 55

Séries	pH	N. ammoniacal	Azote nitrique
1	2.23	34.72	34.84
2	5.19	34.13	35.48
3	6.83	31.08	35.36

L'examen des résultats (tableau 56) montre un développement assez faible du mycélium.

Consommation d'azote ammoniacal et légère attaque de l'ion NO^3 surtout dans les séries 2 et 3.

Après avoir subi une acidification le milieu revient dans une zone plus alcaline.

TABLEAU 56

Culture directe de *Mucor corymbifer* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajusté à 3 pH différents.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
		4	pts blancs					
3.23	1	7	« «					
		14	0.005	3.115	33.56	1.16	34.52	0.32
		4	0.2585	3.555	9.12	25.01	34.24	1.24
5.19	2	7	0.2775	3.027	12.00	22.13	34.48	1
		14	0.2515	4.86	12.84	21.19	34.72	0.76
		4	0.2145	4.45	9.36	21.72	35.08	0.28
6.83	3	7	0.2490	5.11	12.16	18.92	33.84	1.42
		14	0.1950	6.51	16.64	14.44	34.40	0.96

EXPÉRIENCE N° 35. — MUCOR BOULARDH.

Milieu habituel au NO^3NH^4 ajusté à 3 pH différents.

Les dosages des témoins ont donné les résultats suivants (tableau 57) :

TABLEAU 57

Séries	pH	Azote ammon.	azote nitrique
1	3.22	35	35
2	5.19	35	35
3	6.83	35	35

Ce mucor a, sans doute, trouvé la série 1 trop acide ; les récoltes y sont très faibles. Mais il a poussé vigoureusement dans les 2 autres où l'on a obtenu des récoltes de plus de 30 cgr. Notons cependant (Tableau 58) dans la série 2 que le mycélium n'a pas augmenté de poids du 8^e au 14^e jour avec un pH fixé à 6,4. Dans les 3 séries on note une consommation très nette d'azote nitrique allant en croissant du 4^e au 14^e jour. Les milieux

s'acidifient jusqu'au 4^e jour puis se stabilisent à un pH voisin de la neutralité.

TABLEAU 58

Culture directe de *Mucor boudardii*, sur milieu N/10 en NO_3NH_4 à différents pH.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.22	1	4	0.0830	2.57	26.40	13.60	34.96	0.04
		8	0.0815	2.78	27.32	7.68	34.40	0.60
		14	0.0990	2.04	26.08	8.92	34.24	0.76
5.19	2	4	0.2840	3.16	5.68	29.32	34.04	0.96
		8	0.3115	6.44	9.68	25.32	33.60	1.40
		14	0.2885	6.44	11.44	23.56	33.16	1.84
6.83	3	4	0.3615	5.256	1.12	33.88	33.84	1.16
		8	0.2865	5.287	5.92	29.08	33.92	1.08
		14	0.3235	7.169	4.28	30.72	32.96	2.04

EXPÉRIENCE N° 36. — MUCOR GUILLERMONDI.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque ajusté à 3 pH différents. Trois séries de 3 fioles retirées les 4^e, 8^e et 12^e jours.

Le dosage des témoins est relevé au tableau 59.

TABLEAU 59

Séries	pH	N. ammoniacal	N. nitrique
1	3.22	35	35
2	5.19	34.13	35
3	6.83	34.08	35

D'après les résultats relevés au tableau 60 nous remarquons que le *Mucor Guillermondi* ne pousse pas vigoureusement sur ce milieu nitraté. Dans la série acide N° 1 la culture est encore

insignifiante au 12^e jour. Le champignon n'utilise que des traces d'azote ammoniacal et d'azote nitrique.

Dans les deux autres séries la récolte est faible (à peine 10 ctgr. dans la 1^e et moins de 20 ctgr. dans la 3^e). Dans le milieu la réaction reste très acide jusqu'au 12^e jour, indiquant ainsi une acidification très intense du milieu. Il en est de même quoiqu'à un degré moindre de la série 2. Dans la série 3, le milieu, après une légère acidification se stabilise autour de pH = 6,2.

TABLEAU 60

Culture directe de *Mucor guillermonti* sur milieu N/10 en NO_3NH_4 ajusté à différents pH.

pH initial	séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.22	1	4	points bl.	3.03	33.76	1.24	34.96	3.04
		8	0.0080	3.04	31.12	3.88	33.40	1.60
		12	0.0085	1.81	30.24	4.76	34.40	0.60
5.19	2	4	0.026	3.80	29.60	4.53	35.	0
		8	0.118	3.93	21.00	13.13	35.04	0
		12	0.110	3.56	20.40	13.73	34.52	0.48
6.83	3	4	0.023	5.93	25.68	5.40	34.90	0
		8	0.147	6.29	4.80	16.28	35.20	0
		12	0.162	6.19	10.56	21.52	34.08	0.92

Le champignon s'attaque à l'ion ammoniacal surtout dans les milieux N° 2 et 3 (neutre ou faiblement alcalin) et consomme l'ion NO_3 dans le milieu N° 1 (acide).

EXPÉRIENCE N° 37. — *MUCOR PRAINII*.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents, 3 séries de 3 fioles retirées les 4^e, 8^e et 12^e jours.

Le titrage des témoins et les résultats sont relevés dans les tableaux suivants (T.61 et T. 62).

TABLEAU 61

Séries	pH	Azote ammon.	Azote nitrique
1	3.22	35	35
2	5.19	34.13	35
3	6.83	31.08	35

TABLEAU 62

**Culture directe de *Mucor Prainii* sur milieu N/10 en NO^3NH_4
ajusté à différents pH.**

P H initial	Série	Temps jours	Mycélium grammes	p H	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					N. résiduel	N. disparu	résiduel	disparu
3.22	1	4	0.021	3.557	31.96	3.04	33.56	1.44
		8	0.0355	2.628	30.	5.00	34.64	0.36
		12	0.0360	3.114	29.96	5.01	33.72	1.28
5.19	2	4	0.097	4.52	19.20	14.93	34.40	0.60
		8	0.158	3.625	12.12	22.01	34.52	0.48
		12	0.1725	4.796	12.72	21.41	32.12	2.88
6.83	3	4	0.107	5.22	14.16	16.92	34.40	0.60
		8	0.126	5.13	13.04	18.04	35.08	0.
		12	0.125	5.73	14.28	16.80	34.08	0.92

Ce mucor a également poussé d'une manière irrégulière. La série 1 probablement trop acide n'a donné naissance qu'à un mycélium atteignant 4 ctgr. le 12^e jour et dans les 2 autres le poids du champignon reste stationnaire entre les 8^e et 12^e jours. Après une acidification légère les milieux se stabilisent à un pH peu différent de celui du point de départ.

Le champignon consomme l'azote ammoniacal les premières heures puis attaque l'ion nitrique.

La consommation de l'ion nitrique est surtout marquée dans les deux premières séries tandis que celle de l'ion ammoniacal l'est dans les deux dernières.

EXPÉRIENCE N° 38. — *MUCOR RACEMOSUS*.

Milieu habituel au NO^3NH^4 ajusté à 3 pH différents. 3 séries de fioles retirées les 4^e, 6^e et 14^e jours.

Le dosage des témoins est relevé au tableau 63.

TABLEAU 63

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.35	34.72	35
2	4.92	34.13	35.48
3	6.74	31.08	35.36

L'examen des résultats (tableau 91) montre que le *Mucor racemosus* ne pousse guère mieux que les autres *Mucors* sur milieu nitraté aux pH considérés.

Faible consommation d'azote ammoniacal et consommation nulle d'azote nitrique sauf dans la série 2. On peut sans doute attribuer ce fait au faible développement du mycélium.

TABLEAU 64

Culture directe de *Mucor racemosus* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajusté à différents pH.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.35	1	4	non poussé	3.097	—	—	—	—
		6	rare pts blancs	2.88	—	—	—	—
		14	0.0075	2.35	33.40	1.32	35.16	0
4.92	2	4	0.0160	3.95	32.16	1.97	34.96	0.52
		6	0.029	4.11	29.24	4.89	34.76	0.72
		14	0.017	4.75	30.92	3.21	35.20	0.28
6.74	3	4	0.008	5.95	26.60	4.48	35.48	0
		6	0.012	6.01	27.72	3.36	34.96	0.40
		14	0.013	6.44	28.72	2.36	35.44	0

EXPÉRIENCE N° 39. — MUCOR SPINOSUS.

Milieu habituel au NO^3NH^4 ajusté à 3 pH différents.

3 séries de fioles retirées les 4^e, 6^e et 14^e jours.

Le titrage des témoins est indiqué au tableau 65 et les résultats sont relevés sur le tableau 66.

TABLEAU 65

Série	pH	N/ NH^3	N/ NO^3
1	3.35	34.72	34.84
2	4.92	34.13	34.40
3	6.74	31.08	34

TABLEAU 66

Culture directe de *Mucor spinosus* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajusté à différents pH.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH final	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.35	1	4	non poussé	3.17	34.36	0.36	34.96	0
			pts					
		6	blancs	3.18	34.88	0	34.88	0
		14	0.0025	3.50	33.80	0.92	34.42	0.72
4.92	2	4	0.055	3.74	25.28	8.85	34.96	0.52
		6	0.0625	3.82	24.16	9.97	34.80	0.68
		14	0.056	3.99	23.32	10.81	35.60	0
6.74	3	4	0.0605	4.97	21.36	9.72	34.80	0.56
		6	0.063	1.908	20.00	11.08	34.72	0.64
		14	0.043	5.30	21.74	9.34	35.64	0

Nous voyons que ce champignon a poussé très difficilement dans nos milieux. C'est ainsi que dans la série 1 on n'obtient au bout de 14 jours qu'une récolte de 2 mmgrs 5.

Faible consommation d'azote ammoniacal et consommation nulle d'azote nitrique.

Aucune conclusion nette ne peut être tirée ici en raison du trop faible développement du mycélium.

2° — *Genre Rhisopus.*

EXPÉRIENCE N° 40. — RHISOPUS NIGRICANS.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents. 3 séries de fioles retirées les 3^e, 7^e et 10^e jours.

Le titrage des témoins donne les résultats suivants (tab. 67),

TABLEAU 67

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.35	34.4	34.4
2	4.92	34.4	34.4
3	6.74	34.4	34.4

Le tableau N° 68 montre que ce *Rhisopus* a poussé d'une manière satisfaisante sur ce milieu (sauf, peut-être, sur le milieu 1). Il a consommé l'azote ammoniacal, le maximum étant atteint dans les deux dernières séries. L'attaque de l'ion nitrique est très faible dans la série 1, insignifiante dans la série 2 et nulle dans la série 3.

TABLEAU 68

**Culture directe de *Rhizopus nigricans* N/10 en NO_3NH_4
ajusté à différents pH.**

Ph initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	p H final	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.35	1	3	0.024	3.045	29.4	5	34.40	0
		7	0.114	2.84	24.68	9.72	34.04	0.36
		10	0.125	2.82	23.72	10.68	34.16	0.24
4.92	2	3	0.088	4.56	30.6	3.80	34.16	0.24
		7	0.336	3.42	8.48	25.92	34.04	0.36
		10	0.326	4.02	9.00	24.60	34.56	0
5.74	3	3	0.039	6.09	28.08	5.12	34.40	0
		7	0.238	5.21	11.96	21.24	34.48	0
		10	0.313	4.68	7.60	25.60	37.76	0

Acidification nette du milieu de culture.

EXPÉRIENCE N° 41. — *RHIZOPUS NIGRICANS*.

Expérience identique à la précédente. Mêmes témoins (tableau 67). Les résultats expérimentaux relevés au tableau 96 confirment ceux de l'expérience précédente. Le *Rhizopus nigricans* n'utilise que faiblement l'ion NO_3 dans nos conditions expérimentales.

Nous notons également une acidification nette du milieu due vraisemblablement à la libération de l'ion acide lors de la consommation de l'azote ammoniacal du nitrate d'ammoniaque.

TABLEAU 69

Culture directe de *Rhisopus nigricans*, milieu N/10 en NO^3NH^4
ajusté à différents pH.

P H initial	Séries	T. mps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.35	1	3	0.020	3.15	29.88	4.52	34.16	0.24
		7	0.107	2.85	24.88	9.52	34.08	0.32
		10	0.111	2.86	24.76	9.64	34.5	0
4.92	2	3	0.021	4.20	24.36	9.04	33.80	0.60
		7	0.288	3.48	10.00	24.4	34.48	0
		10	0.291	4.52	8.72	25.58	34.56	0
6.74	3	3	0.043	6.24	26.76	6.44	34.32	0.08
		7	0.185	5.08	15.20	19.20	34.40	0
		10	0.328	4.81	8.40	22.80	34.40	0

EXPÉRIENCE N° 42. — RHISOPUS REFLEXUS.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents. 3 séries de fioles retirées les 4^e, 8^e et 12^e jours.

Le titrage des témoins est indiqué au tableau 70.

TABLEAU 70

Séries	pH	Azote amm.	Azote nitr.
1	3.31	34.53	34.52
2	4.90	34.53	34.53
3	6.60	34.84	34.53

L'examen des résultats montre que ce *Rhisopus* pousse très bien sur notre milieu en consommant l'azote ammoniacal particulièrement dans les milieux neutres ou alcalins. On note une tendance à utiliser également l'ion NO^3 en un lieu acide (1 et 2).

TABLEAU 71

Culture directe de *Rhisopus reflexus* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajustés à différents pH.

pH initial	Séries	Temps en Jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	utilisé	résiduel	utilisé
3.31	1	4	0.014	3.19	31.20	3.33	33.96	0.57
		8	0.0225	3.2	30.76	3.77	22.80	1.53
		12	0.049	3.07	29.69	4.84	34.32	0.21
4.90	2	4	0.052	4.43	28.12	6.42	34.16	0.37
		8	0.304	3.43	11.76	22.77	34.44	0.09
		12	0.283	3.73	13.72	20.81	34.86	0
6.60	3	4	0.028	5.70	26.04	4.80	33.88	0.65
		8	0.251	4.91	11.44	19.40	34.72	0
		12	0.265	4.75	8.32	22.32	34.72	0

EXPÉRIENCE N° 43. — RHISOPUS REFLEXUS.

Expérience identique à la précédente. Mêmes témoins. (Tableau 70).

TABLEAU 72

Culture directe de *Rhisopus reflexus* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajusté à différents pH.

pH initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	Consommé	résiduel	Consommé
3.31	1	4	0.018	3.17	32.28	2.25	33.8	0.73
		8	0.032	3.09	29.16	5.37	33.8	0.73
		12	0.062	3.11	29.96	4.57	34.60	0
4.90	2	4	0.043	4.52	28.72	5.81	34.56	0
		8	0.269	3.48	10.40	24.13	34.88	0
		12	0.313	3.67	11.88	22.65	34.52	0
6.60	3	4	0.014	5.76	27.56	3.28	33.92	0.61
		8	0.328	4.91	9.76	21.08	34.36	0.17
		12	0.401	5.57	20.88	9.96	34.40	0.13

Ce tableau nous montre que le *Rhizopus reflexus* utilise surtout l'ion NH_3 en milieu alcalin et l'ion nitrique peut être en milieu acide.

3° — *Genre Absidia*.

EXPÉRIENCE N° 44. — *ABSIDIA DUBIA*.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents.

Les 3 séries de fioles sont retirées les 4^e, 8^e et 12^e jours.

Le titrage des témoins et les résultats expérimentaux sont indiqués sur les tableaux 73 et 74.

TABLEAU 73

Séries	pH	N/ NH_3	N/ NO_3
1	2.20	35	35
2	4.70	34.53	34.53
3	5.70	31	35.24

TABLEAU 74

Culture directe d'*Absidia dubia* sur milieu N/10 en NO_3NH_4 ajusté à différents pH.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	p H	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
2.20	1	4	0.022	2.97	30.50	4.50	29.99	5.01
		8	0.080	2.00	27.00	8.00	28.92	6.08
		12	0.098	2.28	25	10.00	26.90	8.10
4.70	2	4	0.084	3.47	11.44	23.09	23.32	11.21
		8	0.112	3.37	7.68	26.85	23.52	11.01
		12	0.240	3.49	7.44	27.09	23.76	11.77
5.70	3	4	0.0702	4.69	6.64	24.36	24.24	11.00
		8	0.145	4.58	8.68	22.32	22.92	12.32
		12	0.250	4.54	8.56	22.44	22.80	12.44

L'examen de ces résultats nous montre que cet *Absidia* pousse très bien sur notre milieu. Il consomme à la fois l'azote nitrique et l'azote ammoniacal. Le phénomène est net dans les trois séries.

Les mycéliums atteignent un poids moyen voisin de 30 ctgr. en 12 jours (sauf dans la série 1).

EXPÉRIENCE N° 45. — *ABSIDIA DUBIA*.

Expérience identique à la précédente. Mêmes milieux de culture et mêmes témoins. (Tableau 75).

Les résultats relevés au tableau 102 confirment entièrement les précédents.

TABLEAU 75

Culture directe d'*Absidia dubia* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajusté à différents pH.

pH initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote Nitrique	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
2.20	1	4	0.027	2.80	30	5	32	3.00
		8	0.088	2.10	26	9	32.98	2.02
		12	0.100	2.30	24	11	32.10	2.90
4.70	2	4	0.080	3.52	11.60	22.93	23.68	10.85
		8	0.128	3.315	7.32	27.21	23.48	11.05
		12	0.290	3.49	6.60	27.93	22.73	11.80
5.70	3	4	0.088	4.93	6.50	24.50	22.96	12.28
		8	0.127	4.54	6	25	23.64	11.60
		12	0.287	4.51	3	29	22.82	12.42

EXPÉRIENCE N° 46. — *ABSIDIA RACEMOSA*.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents, 3 séries de 2 fioles retirées les 4^e, 7^e et 11^e jours. Les fioles étant retirées deux par deux les résultats sont obtenus en double, et les chiffres relevés sur le tableau suivant sont obtenus en faisant la moyenne entre les deux séries de résultats.

Le titrage des témoins est inscrit sur le tableau suivant (76).

TABLEAU 76

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.23	35	35
2	5.19	34.13	35
3	6.83	31.08	35

L'examen des résultats montre que l'*Absidia racemosa* pousse bien sur notre milieu en consommant surtout l'azote ammoniacal.

Cependant l'attaque de l'ion nitrique, d'abord nulle (4^e jour) s'effectue lentement et atteint 4 mmgrs. en 11 jours. Il ne semble pas y avoir de différence entre les diverses séries.

Le milieu de culture subit d'abord une très forte acidification par suite de l'assimilation de la molécule alcaline ; puis s'alcalinise lorsque la molécule acide disparaît à son tour.

TABLEAU 77

Culture directe d'*Absidia racemosa* sur milieu N/10 en NO³NH⁴ ajusté à différents pH.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycétium en grammes	p H	N/NH ³		N/NO ³	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.23	1	4	0.028	2.98	31.44	3.56	34.80	0.20
		7	0.076	2.04	27.92	7.08	34	1.00
		11	0.126	2.43	23.96	11.04	34.44	0.36
5.19	2	4	0.090	4.04	23.24	10.89	35	0
		7	0.217	2.58	11.04	23.09	33.60	1.32
		11	0.340	4.10	9.16	24.97	30.36	4.64
6.83	3	4	0.064	5.45	21.44	9.64	34.96	0.04
		7	0.254	3.95	8.48	22.60	32.40	2.60
		11	0.230	8.56	11.96	19.02	31.48	3.52

4. — Genre *Cunninghamella*

EXPÉRIENCE N° 47. — CUNNINGHAMELLA ECHINULATA.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque ajusté à 3 pH différents. 3 séries de 2 fioles retirées les 4^e, 8^e et 12^e jours.

Les résultats ont été obtenus en double et les chiffres relevés au tableau 79 sont les moyennes des deux séries.

Le dosage des témoins est noté au tableau 78.

TABLEAU 78

Séries	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.23	35	35
2	5.19	34.13	35
3	6.83	31.08	35

D'après les résultats du tableau 79 nous voyons que cette Moisissure pousse bien sur ce milieu, et consomme l'azote ammoniacal. Elle attaque même l'ion NO³ en assimilant plus de 10 mmgr. le 12^e jour dans la série 3.

Acidification nette.

TABLEAU 79

Culture directe de *Cunninghamella echinulata* sur milieu N/10 en NO³NH³ ajusté à différents pH.

pH initial	Séries	Temps en jours	pH	Mycélium en grammes	Azote ammoniacal		Azote Nitrique	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.23	1	4	2 645	0.0195	32 04	2.96	34.88	0.12
		8	2.87	0.025	31.08	3.92	34.48	0 52
		12	2 86	0.0295	30.76	4.24	34.32	0.68
5.19	2	4	3.166	0.179	12.44	21.69	34.24	0.76
		8	2.985	0.284	4.24	29.89	32.04	2.96
		12	2 906	0.405	1.04	33.09	28.76	6.24
6.83	3	4	3 47	0.254	0.44	30.64	32.12	2.88
		8	4 24	0.354	1.08	30	29.44	5.56
		12	6 267	0.419	3.88	27.20	24.60	10.40

5. — *Genre Circinella.*

EXPÉRIENCE N° 48. — CIRCINELLA SPINOSA.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque ajusté à 3 pH différents. 3 séries de fioles sont placées à l'étuve pendant 4, 7 et 14 jours.

Les résultats relevés au tableau suivant *sont obtenus en faisant la moyenne des deux séries de chiffres.*

Les témoins sont notés sur le tableau 80.

TABLEAU 80

Séries	pH	N/NO ³	N/NH ³
1	3.23	35	35
2	5.19	34.13	35
3	6.83	31.08	35

Le tableau 81 nous montre que le *Circinella spinosa* n'utilise l'ion nitrique qu'au bout de 14 jours. Le maximum de consommation est atteint dans la série 2.

Mais la moisissure assimile l'ammoniaque surtout en milieu neutre ou alcalin.

Légère acidification.

TABLEAU 81

Culture directe de *Circinella spinosa* sur milieu N/10 en NO³NH⁴ ajusté à différents pH.

p H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	p H	N/NH ³		N/NO ³	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.23	1	4	pts blancs	3.09	33.92	1.08	34.88	0.12
		7	0.012	3.07	33	2.0	34.98	0.02
		14	0.025	3.29	31.68	3.32	34.32	0.68
5.19	2	4	0.084	4.28	23.72	10.41	35.12	0.
		7	0.172	3.56	13.20	20.93	34.16	0.88
		14	0.268	4.29	6.08	27.85	30.88	4.12
6.83	3	4	0.078	5.47	20.00	11.08	34.88	0.12
		7	0.135	4.83	13.20	17.88	34.88	0.12
		14	0.301	5.03	9.16	24.92	31.84	3.16

6. — *Genre Glomerula.*

EXPÉRIENCE N° 49. — GLOMERULA REPENS.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque ajusté à 3 pH différents. 3 séries de 2 fioles sont portées à l'étuve pendant 4, 8 et 11 jours. Les chiffres notés sur le tableau suivant *résultent de la moyenne des résultats obtenus avec les deux fioles.*

Le dosage des témoins est relevé sur le tableau 82.

TABLEAU 82

Séries	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.23	35.00	35
2	5.19	34.10	35
3	6.83	31.08	35

TABLEAU 83

Culture directe de *Glomerula repens* sur milieu N/ 10 en NO³NH⁴ ajusté à différents pH.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	N/NH ³		N/NO ³	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.23	1	4	pts blancs	2.90	33.68	1.32	34.72	0.28
		8	» »	3.34	33.56	0.54	34.68	0.32
		11	0.007	3.99	33.40	0.60	34.68	0.32
5.19	2	4	0.256	3.22	11.40	22.70	33.96	1.04
		8	0.290	3.47	13.00	21.10	33.04	1.96
		11	0.281	4.08	12.10	22.0	33.64	1.36
6.83	3	4	0.293	4.07	1.80	29.28	32.56	2.44
		8	0.284	5.86	9.52	21.56	32.24	2.76
		11	0.280	6.45	11.08	20.00	32.44	2.56

Cette moisissure consomme l'ion NH³ surtout, de préférence à l'ion NO³ qu'il n'attaque que légèrement.

Acidification très nette du milieu.

**Conclusions sur l'aptitude des mucorinées
à assimiler l'ion nitrique.**

Notre étude sur les Mucorinées, quoique très incomplète, donne cependant un ensemble de résultats assez cohérents.

On peut dire, en effet, que la majorité des Mucorinées se conduit vis-à-vis du nitrate d'ammoniaque de façon analogue à celle que nous avons observée de l'*Aspergillus repens*.

Si nous considérons les résultats moyens obtenus au 7^e jour de culture, on remarque sur les 14 espèces examinées que 4 assimilent le maximum de l'ion NO^3 en milieu très acide, 7 en milieu faiblement acide et aucun en milieu neutre ou alcalin.

Inversement aucun n'absorbe d'ammoniaque en milieu très acide 7 assimilent la plus grande partie de l'ion NH^3 en milieu faiblement acide et 4 en milieu alcalin.

Nous mettrons à part les 3 espèces suivantes où l'absorption des ions NO^3 et NH^3 suit une marche parallèle et où le maximum se trouve dans les 3 cas en milieu neutre avec prépondérance nette d'absorption de l'ion NH^3 . Ce sont les espèces : *Absidia ramosa*, *Cunninghamella* et *Glomerula repens*.

Naturellement, comme nous n'avons pas employé la technique des voiles solides, nous nous heurtons là aux imperfections déjà signalées de la méthode de culture directe.

Généralement les espèces examinées ont bien poussé sur les milieux au nitrate de NH^3 . Cependant on peut dire que d'une manière générale les milieux n° 1 très acides étaient ceux où la récolte fut la plus faible. Le maximum de croissance était surtout observé dans les séries 2 (faiblement acide) ou 3 (neutre ou alcaline).

On doit sans doute attribuer au développement irrégulier des mycéliums le manque de netteté de l'absorption maximum de l'une ou l'autre forme d'azote observé chez les 3 espèces que nous citions tout à l'heure.

Très souvent nous remarquons au bout du 14^e jour un commencement d'autolyse marqué par une régression du poids du mycélium et une augmentation de l'Azote ammoniacal résiduel.

L'étude de la nutrition azotée des Mucorinées a, du reste, été faite depuis longtemps. Cependant elle fut, au début, longtemps entachée d'erreur, car l'absorption de la partie assimilable des sels offerts entraînait la libération, soit de base forte soit d'acide fort. Par voie de conséquence l'organisme étudié était gêné dans son développement non par suite de son absorption d'azote mais par suite de trop grandes variations de la réaction du milieu.

C'est ainsi que LAURENT (28 à 33), ayant classé les Moisissures en deux grands groupes, les « Nitrophiles » et les « Ammoniophiles », divers auteurs furent amenés à reprendre cette classification en la rendant dépendante du pH.

L'addition de substances tampons a permis, du reste, d'éliminer en grande partie cette cause d'erreur.

D. BACH (3 et 4), dans diverses communications, en 1927, a précisé que la plupart des Mucorinées étaient capables d'assimiler l'ion NO_3^- avec de bons rendements à condition d'utiliser un milieu stabilisé : nos résultats confirment ces recherches.

« Les divers *Rhizopus*, *Absidia*, *Lichtemia*, dit-il, sont incapables d'utiliser l'N des nitrates. Par contre, les espèces des genres *Mucor*, *Circinella*, *Cunninghamella*, se développent toutes sur NO_3K . Quelques espèces : *Mucor*, *Glomerula* acidifient d'abord le milieu (pH 3) puis on assiste à une alcalinisation considérable qui amène les cultures jusqu'à pH 9 (avec protéolyse) ».

Nos résultats confirment pleinement ceux-ci. En effet, nous observons chez les genres *Rhizopus* et *Absidia* la disparition de quantités très minimes d'N/ NO_3^- .

CHAPITRE II

ETUDE DE QUELQUES PERISPORIACÉES

Nous avons étudié 4 genres de la famille des Périsporiacées (Ascomycètes).

Comme dans le chapitre précédent, nous avons opéré dans des conditions aussi identiques que possible entre elles.

Dans presque tous les cas, nous avons utilisé la méthode de culture directe. Nous avons suivi notre technique habituelle de culture directe en milieu au nitrate d'ammoniaque ajusté à 3 pH différents (voir p. 137, chapitre précédent). Nous avons employé des milieux analogues à ceux dont nous avons donné la formule (V. p. 137).

Dans tous les cas on porte à l'étuve une série de 6 fioles que l'on retire 2 par 2 à intervalles réguliers. Tous les dosages sont donc faits en double.

1. — Genre *Aspergillus*

EXPÉRIENCE N° 50. — *ASPERGILLUS NIGER*.

Nous avons utilisé la technique de culture directe précédemment décrite en utilisant notre milieu habituel.

Le titrage des témoins donne les résultats suivants (Tableau 84).

TABLEAU 84

Série	ph	N/NO ³	N/NH ⁴
1	3.5	34.16	34.16
2	4.5	34.16	34.16
3	6.5	34.16	34.16

D'après les résultats relevés sur le tableau 85 nous voyons que le champignon, tout en préférant l'ion NH_3 consomme cependant l'ion NO_3 ; et que près de 10 mmgrs de ce dernier disparaissent en 7 jours dans la série 2.

Le mycélium donne rapidement une récolte de 20 ctgr., passant à 40 le 5^e jour, mais diminuant dans les heures suivantes par suite de la protéolyse (séries 2 et 3).

Acidification nette du milieu de culture par suite de la consommation prépondérante de l'ion ammoniacal.

TABLEAU 85

Culture directe d'*Aspergillus niger* sur milieu au nitrate d'ammoniaque tamponné avec 2 % de citrate de soude et ajusté à 3 pH différents.

pH initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	Azote ammoniacal		Azote nitrique	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.5	1	3	0.149	3.07	22.68	11.48	33.18	0.99
			0.378	2.33	4.48	29.68	32.62	1.54
		5	0.554	2.02	1.68	32.48	32.06	2.10
			0.511	2.13	1.12	33.04	32.06	2.10
		7	0.459	2.81	12.18	22.78	31.08	3.08
			0.508	2.50	6.58	28.38	33.60	1.36
4.5	2	3	0.258	3.81	13.86	20.30	33.32	0.84
			0.158	4.22	19.5	15.66	32.20	0.96
		5	0.487	7.11	3.08	31.08	28.7	5.46
			0.437	7.31	4.62	29.54	29.96	4.20
		7	0.287	6.09	13.16	21.00	26.46	7.70
			0.350	6.10	13.06	21.10	26.40	7.76
6.5	3	3	0.286	4.36	8.12	26.04	33.18	0.98
			0.154	4.67	18.48	15.68	32.20	0.96
		5	0.376	6.45	3.08	31.08	29.96	4.20
			0.461	6.13	1.06	33.00	29.54	4.62
		7	3.303	6.21	9.38	24.78	26.40	7.76
			0.284	6.18	10.36	23.70	26.46	7.70

EXPÉRIENCE N° 51. — ASPERGILLUS NIDULANS.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents. 3 séries de 3 fioles retirées au bout de 2, 4 jours et demi et 7 jours et demi.

Le titrage des témoins donne les résultats relevés au tableau 86.

TABLEAU 86

Série	pH	N/NOH ³	N/NO ³
1	3.23	35	35
2	5.19	35	35
3	6.83	35.75	35

Les résultats du tableau 87 montrent que l'Aspergillus nidulans a très bien poussé sur ce milieu surtout dans les séries 2 et 3. Forte consommation d'azote ammoniacal et consommation très nette d'azote nitrique surtout dans les séries 1 et 2.

TABLEAU 87

Culture directe d'Aspergillus nidulans sur milieu N/10 en NO³NH⁴ ajusté à différents pH

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycelium en grammes	p H	N/NH ³		N/NO ³	
					résiduel	disparu	résiduel	disparu
3.23	1	2	0.006	2.97	34.75	0.25	32.72	2.28
		4.5	0.334	2.85	18.9	16.10	25.76	9.24
		7.5	0.380	2.91	18.20	16.80	25.3	9.7
5.19	2	2	0.021	4.42	32.97	2.03	30.19	4.81
		4.5	0.530	4.52	6.02	28.98	28.00	7
		7.5	0.425	4.93	2.80	32.20	25.5	9.5
6.85	3	2	»	»	»	»	»	»
		4.5	0.210	5.51	16.66	18.09	33.18	1.82
		7.5	0.511	7.12	0.16	34.59	30.07	4.3

EXPÉRIENCE N° 52. — ASPERGILLUS NIDULANS.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents. Même technique que dans l'expérience précédente, mêmes témoins (tableau 86). L'examen des résultats (tableau 88) confirme ceux de l'expérience précédente. En milieu acide, il y a consommation d'azote sous ses deux formes avec prépondérance de l'azote ammoniacal.

Ces résultats sont comparables en tous points avec ceux que nous avons obtenus avec l'*Aspergillus repens*.

TABLEAU 88

Culture directe d'*Aspergillus nidulans* sur milieu N/10 en NO_3NH_4 ajusté à différents pH.

P H initial	Série	Temps jours	Mycélium grammes	p H	N/NH ₃		N/NO ₃	
					résiduel	utilisé	résiduel	utilisé
3.23	1	2	0.010	3.06	35.01	0	32.97	2.03
		4.5	0.311	3.17	20.72	14.28	29.68	5.32
		7.5	0.367	2.84	18.06	16.94	25.6	9.4
5.19	2	2	0.006	4.55	35.06	0	28.18	6.82
		4.5	0.305	4.72	20.86	14.14	29.68	5.32
		7.5	0.438	7.88	2.58	32.42	26.6	8.4
6.83	3	2	»	»	»	»	»	»
		4.5	0.174	5.54	17.34	17.41	35.00	0
		7.5	0.510	7.52	20.30	14.45	31.2	3.8

2. — Genre *Sterigmatocystis*.

EXPÉRIENCE N° 53. — STERIGMATOCYSTIS BUTYRACEA.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents. On place 3 séries de fioles à l'étuve pendant 4, 8 et 12 jours. Le titrage des témoins donne les résultats suivants (tableau 89).

TABLEAU 89

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.23	35	35
2	5.19	35	35
3	6.83	34	35

Le tableau 90 nous montre que cette moisissure pousse bien sur ce milieu en consommant N/NH³ et N/NO³.

Le maximum de consommation de N/NH³ est en milieu alcalin tandis que le maximum pour N/NO³ est en milieu acide.

TABLEAU 90

Culture directe de *Sterigmatocystis* sur milieu N/10 en NO³NH⁴ ajusté à différents pH.

pH initial	série	temps jours	mycélium grammes	pH	N/NH ³		N/NO ³	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.23	1	4	0.055	3.45	33.08	01.92	33.01	01.96
		8	0.213	4.11	24.24	10.76	24.24	10.76
		12	»	»	11.92	23.08	19.96	15.04
5.19	2	4	0.293	4.73	14.52	20.48	31.88	03.12
		8	0.513	6.87	5.08	29.95	29.68	05.32
		12	»	»	9.44	25.56	29.96	5.04
6.83	3	4	0.298	5.55	9.64	25.36	33.88	1.12
		8	0.573	7.19	1.08	33.92	30.84	4.16
		12	»	»	5.92	29.08	30.96	4.04

3. — Genre *Penicilium*.

EXPÉRIENCE N° 54. — *PENICILIUM CLAVATUM*.

Cette moisissure n'a pas poussé sur nos milieux nitrates habituels à aucun des pH considérés.

EXPÉRIENCE N° 55. — *PENICILIUM GLAUCUM*.

Nous avons utilisé le milieu suivant :

Nitrate d'ammoniaque	8 gr.
Glucose	50 gr.
Constante minérale	50 gr.
Eau bidistillée, q. s. p.	1.000 gr.

On ajuste à 3 pH différents.

Le milieu distribué à raison de 25 cc³ par fiole, est stérilisé puis ensemencé par émulsion de spores. On porte 3 séries de fioles à l'étuve pendant 2 et 4 jours.

Le titrage des témoins donne les résultats suivants (tableau 91 :

TABLEAU 91

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.53	35	35
2	4.66	35	35
3	6.67	35	35

Les résultats relevés au tableau 92 montrent une acidification intense et rapide, due à l'absence de citrate. On remarquera aussi la faible croissance du mycélium (quelques centigr.).

La consommation de N/NH³ est faible ; la consommation de N/NO³ est très faible ou nulle.

TABLEAU 92

Culture directe de *Penicilium glaucum* sur milieu au NOH^3NH^4 non tamponné et ajusté à différents pH.

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	P H	N/NH ₃		N/NO ₃	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.53	1	2	0.028	4.29	35.17	0	34.65	0.35
			0.014	4.41	34.20	0.80	35.5	0
		4	0.0525	2.38	32.75	2.25	35	0
			0.055	2.39	32.37	2.63	34.82	0.18
4.66	2	2	0.014	3.39	30.70	4.30	36.10	0
			0.005	4.17	33.77	1.23	34.82	0.18
		4	0.043	2.40	32.02	2.98	33.95	1.05
			0.0425	2.39	32.02	2.98	34.50	0.50
6.67	3	2	0.041	4.99	30.70	4.30	33.60	1.40
			0.042	5.12	30.97	4.03	35	0
		4	0.0715	2.42	28.70	6.30	33.70	1.30
			0.088	2.42	28.70	6.30	35	0

3. — Genre *Botrytis*.

EXPÉRIENCE N° 56. — BOTRYTIS CINERIA.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents. 3 séries de fioles retirées les 15^e, 22^e et 37^e jours.

Nous avons été obligé d'attendre jusqu'au 37^e jour afin d'avoir un mycélium assez développé et cependant dans la série 3 nous n'avons observé encore qu'un voile insignifiant.

Les témoins ont donné les résultats relevés au tableau 93.

TABLEAU 93

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.23	35.0	35
2	5.19	34.10	35
3	6.83	31.08	35

TABLEAU 94

P H initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	p H	N/NH ³		N/NO ³	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.23	1	15	plaq. et ilots blancs	3.16	«	«	«	«
		22	0.2265	2.54	24.0	11.0	35.10	0
		37	mycel. glai- reux, immergé	3.3	30.0	5.0	35	0
5.19	2	15	0.4535	3.30	14.50	19.60		0
		22	0.4685	3.07	16.00	18.10	34.82	0.18
		37	0.2175	2.50	22.10	12.0	34	«
6.83	3	15	rare pts bl. immerg.	6.68	«	«	«	«
		22	n'a pas poussé	6.45	«	«	«	«
		37	n'a pas poussé	6.30	«	«	«	«

**Conclusions sur l'aptitude de certaines perisporiacées
à assimiler NO³.**

Nous avons étudié dans ce chapitre 6 espèces différentes de Périssporiacées, 4 ayant régulièrement poussé sur un milieu au nitrate d'ammoniaque.

Par contre deux n'ont donné naissance à aucun développement, ce sont : le *Botrytis cineria* et le *Penicilium clavatum*.

Les *Aspergillus niger* et *nidulans*, le *Sterigmatocystis*, le *Penicilium glaucum* se sont, en gros, comportés comme l'*Aspergillus repens*.

Si nous considérons le résultat de 7 à 8 jours de culture, on voit que :

4 champignons ont vu le maximum d'absorption de l'ion NO^3 en milieu acide. Deux ont vu le maximum d'absorption de l'ion NH^3 en milieu faiblement acide et deux en milieu alcalin.

Ces résultats confirment ceux obtenus par différents auteurs. (TANRET (73), KLOTZ (24), etc., et COUPIN, 1827 (18).

Là encore ces moisissures absorbent de préférence NO^3 en milieu acide et NH^3 de préférence en milieu alcalin.

CHAPITRE III.

ETUDE DE QUELQUES HYPHOMYCETES

Nous avons groupé dans ce chapitre 3 moisissures assez communes :

1° *Fusarium roseum*,

2° *Alternaria solani*,

3° *Dematium pullulans*.

EXPÉRIENCE N° 57. — FUSARIUM ROSEUM.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque ajusté à 3 pH différents, 3 séries de fioles retirées de l'étuve les 4^e, 9^e et 12^e jours.

Le titrage des témoins est relevé au tableau suivant (95).

TABLEAU 95

Série	pH	N/NH ³	N/NO ³
1	3.23	35	35
2	5.19	34.13	35
3	6.83	31.08	35

D'après les résultats expérimentaux (tableau 96) nous voyons que le *Fusarium* a surtout utilisé l'ion nitrique en milieu acide. Le maximum est atteint dans la série 2. Inversement, la consommation de l'ion NH³ a surtout lieu dans les milieux alcalins.

On note une alcalinisation particulièrement forte dans la série 3 et vraisemblablement un commencement de protéolyse.

TABLEAU 96

Culture directe de *Fusarium roseum* sur milieu N/10 en NO^3NH^4 ajusté à différents pH.

pH initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	N/NH ₃		N/NO ₃	
					résiduel	utilisé	résiduel	utilisé
3.23	1	4	points blancs	3.17	33.88	1.12	34.48	0.52
		9	0.008	3.06	33.68	1.32	33.72	1.28
		12	0.0085	3.63	33.20	1.80	33.56	1.44
5.19	2	4	0.1415	3.98	19.80	14.37	32.36	2.64
		9	0.310	3.20	3.64	30.49	30.24	4.76
		12	0.3265	2.82	3.04	31.09	30.72	4.28
6.83	3	4	points blancs	6.41	29.52	2.56	34.28	0.72
		9	0.334	4.84	1.08	30.	32.44	2.56
		12	0.276	6.91	6.00	24.88	31.16	3.84

EXPÉRIENCE N° 58. — *ALTERNARIA SOLANI*.

Cette moisissure n'a pas poussé sur notre milieu nitraté à aucun des pH considérés, même au bout de 12 jours.

EXPÉRIENCE N° 59. — *DEMATIUM PULLULANS*.

Milieu habituel au nitrate d'ammoniaque, ajusté à 3 pH différents. 3 séries de 2 fioles retirées de l'étuve les 4^e et 8^e jours.

Le dosage des témoins donne les résultats suivants (tableau 97).

TABLEAU 97

Série	pH	N/NH ₃	N/NO ₃
1	3.23	35	35
2	5.19	34	35
3	6.83	31.08	35

TABLEAU 98

Culture directe de *Dematium pullulans* sur milieu N/10 en NO_3NH_4 ajusté à 3 pH différents.

pH initial	Séries	Temps en jours	Mycélium en grammes	pH	N/NH ₃		N/NO ₃	
					résiduel	consommé	résiduel	consommé
3.23	1	4	0.052	2.95	30.56	4.44	34.92	1.08
		8	0.081	2.97	30.48	4.52	32.20	2.80
		20	0.129	2.90	31	4	32	3
5.19	2	4	0.064	4.04	27.04	6.96	33.92	1.08
		8	0.104	4.32	27.0	7	33	2
		20	0.161	4.29	27.05	6.95	32.90	2.10
6.83	3	4	0.004	6.07	29.28	2	34.70	0.50
		8	0.008	6.47	29.08	2	35	0
		20	0.008	6.26	29.08	2	35.40	0

Conclusions

Parmi les quelques hyphomycètes que nous avons examinés, deux nous ont donné des cultures sur notre milieu au nitrate de NH_3 ; ce sont *Fusarium roseum* et *Dematium Pullulans*.

Par contre *Alternaria solani* n'a pas poussé.

Les résultats obtenus sont du même ordre que ceux que nous avons déjà mis en évidence.

V.

CONCLUSIONS

A. — Les résultats obtenus en utilisant la méthode de culture directe n'ont rien apporté de nouveau.

Tout ce que l'on peut dire c'est que certaines espèces sont capables d'absorber plus ou moins l'acide nitrique. Telles sont :

Aspergillus repens, *niger* et *nidulens*.

Sterigmatocystis butyracea, *Penicilium glaucum*.

Les sept mucors dont nous avons donné précédemment la liste.

Cunninghamella echinulata.

Circinella spinosa.

Glomerula repens.

D'autres espèces ne poussent pas sur nos milieux à l'acide nitrique, parmi lesquelles :

Botrytis cinerea, *Penicilium clavatum* et *Alternaria Solani*.

Enfin on peut mettre à part les espèces suivantes où les quantités d'azote nitrique absorbées sont insignifiantes, sans toutefois être nulles :

Rhizopus nigricans, *Rhizopus reflexus*, *Absidia dubia* et *Absidia racemosa*.

B. — Par contre l'utilisation de la technique des voiles solides nous a permis d'obtenir des résultats plus intéressants.

1°. — Absorption de l'ion nitrique.

Le plus gros résultat obtenu est le suivant :

Si l'on fournit de l'acide nitrique à une espèce nitrophyle comme l'*Aspergillus repens*, cet acide est non seulement absorbé mais entre en réaction et sert à l'édification de la molécule azotée nécessaire à la croissance de l'organisme.

On en a pour preuve non seulement la disparition de la molécule nitrique, mais d'une part :

L'apparition dans des conditions nettement précisées d'ammoniaque (issue de la réduction de l'acide nitrique) dans le milieu extérieur tandis que le mycélium n'augmente pas de poids,

et d'autre part :

Dans d'autres conditions (également précisées) l'augmentation régulière du mycélium tandis que l'ammoniaque issue de la réduction de l'acide nitrique ne diffuse pas hors de la cellule.

*
**

La mise en évidence de l'ammoniaque dans le milieu extérieur a été faite en utilisant deux milieux différents :

a) — MILIEU AU NITRATE DE POTASSE.

Pour arriver à mettre en évidence la formation d'ammoniaque on se place en *milieu acide* : dans ce cas on voit apparaître dans le milieu de culture de l'ammoniaque issue uniquement du processus d'assimilation de l'acide nitrique (puisque nous avons opéré sur un milieu ne contenant pas d'ammoniaque et que nous nous sommes mis à l'abri de toute autre production d'ammoniaque). Nos chiffres obtenus et l'explication que nous avons donnée du phénomène cadre avec l'hypothèse de MEYER : savoir que : l'acide nitrique ne pénètre qu'à l'état moléculaire.

On peut dire comme WARBURG « ce qui règle la réduction de l'acide nitrique, c'est la vitesse d'entrée de cet acide dans la cellule. »

Nous n'en voulons pour preuve que l'apparition de NH^3 issue de l'assimilation de NO^3H entré dans la cellule est maximum en *milieu acide* : or, c'est justement en milieu acide, ainsi qu'il résulte des calculs des restes de dissociation, que la quantité de (NO^3H) moléculaire passe par son maximum.

Par exemple dans un milieu très acide à pH 1,61, on observe une transformation considérable de NO^3H en NH^3 . La quantité

d'N/NH³ apparue correspond assez bien au poids de N/NO³ disparu ainsi qu'on le voit dans le tableau suivant qui résume un de nos essais.

TABLEAU 99

Durée du contact en heures					
à pH initial 1,61.	12 h.	24 h.	48 h.	85 h.	113 h.
N/NO ³ H disparu en mmgr...	1,24	0,96	3,52	2,96	3,02
N/NH ³ apparu	1,32	0,72	1,88	2,44	2,88

b) — MILIEU AU NITRATE D'AMMONIAQUE.

La mise en évidence de l'assimilation de l'acide nitrique en utilisant un milieu au nitrate de NH³ ne semble pas avoir été envisagé par d'autres auteurs. Cependant nous montrons, également, que dans un milieu au NO³NH⁴ l'organisme étudié assimile NO³H et le réduit en NH³.

La preuve en est donnée par le fait que nous retrouvons dans le milieu de culture un excès de NH³ par rapport à la quantité initiale.

Par exemple, dans l'expérience suivante, nous avons envisagé l'action de voiles solides d'*Aspergillus repens* sur NO³(NH⁴). Le contact est de 14 heures à 27°. Les quantités initiales d'azote nitrique et ammoniacal sont de 35 mmgr.

Jusqu'à pH 5.45 la consommation de l'azote nitrique l'emporte sur celle de l'azote ammoniacal. C'est du reste un fait bien connu et mis en évidence depuis longtemps (D. BACH, 1925, SAKAMURA, 1925, RIPPEL, 1930).

Mais le fait nouveau que nous apportons et que nous avons du reste déjà signalé (1) est que les milieux à pH 1,89, 3,07, 3,77, non seulement n'ont pas présenté de consommation d'azote ammoniacal, mais au contraire se sont enrichis en NH³ et cet enrichissement (qui n'est pas dû à l'autolyse nulle en milieu sucré acide) est considérable. Il atteint 5 mmgr. à pH 3,07 en 14 heures c'est-à-dire un septième de l'azote mis en œuvre.

(1) D. BACH et J. DESBORDES (10) 1933.

TABLEAU 100

pH initial	1,89	3,07	3,77	4,68	5,45	6,85
Azote nitrique résiduel, en milligr. (quantité initiale : 35 milligr.)	31,2	31,2	28,1	26,7	29,4	34,2
Azote ammoniacal résiduel en milligr. (quant. init. 35 mmgr.)	38	38,9	37	31,8	31,8	32,7
Poids du mycélium en ctgr...	211	267	220	318	261	233

*
**

2° — Condition de la réduction

Il est vraisemblable que la réduction de l'acide nitrique par la cellule vivante soit le fait de diastases spécifiques et que la réaction est due à une deshydrogénase.

Bien que nos expériences ne soient pas adaptées à ce genre de recherches nous pouvons néanmoins spécifier que l'une des conditions nécessaires de la réduction est la présence dans le milieu de culture d'une quantité suffisante de glucides.

Il est vraisemblable de rattacher cette réduction au phénomène général d'oxydo-réduction NO^3 jouant le rôle d'accepteur d'hydrogène et les glucides celui de donateur d'hydrogène.

*
**

3° — Lieu de la réduction.

On a cherché également à savoir si la réduction était due à des diastases endo-cellulaires ou exo-cellulaires et des expériences (IRWIN) (19) ont surtout eu lieu avec des plantes supérieures ou bien des bactéries. Mais on ne trouve guère de références au sujet des Moisissures.

Personnellement, nous n'apportons pas de preuves pour ou contre car nous n'avons pas envisagé le problème de la réduction sous cet angle. La réaction est-elle exo-cellulaire ? C'est possible, néanmoins nous pencherions vers l'inverse.

En effet si la réduction se passait hors de la cellule, il est vraisemblable que la réaction ne serait pas réglée par le pH du milieu de culture : c'est-à-dire par la perméabilité de la membrane aux molécules nitriques.

De plus l'action des déshydrases est bien connue chez différents organismes inférieurs comme les Bactéries et en général leur pH d'action optimum est compris entre 6 et 7, c'est-à-dire très loin de l'action maximum du phénomène de réduction que nous avons observé (pH 1,4).

Il paraît donc peu probable que de telles diastases trouvent hors des cellules, dans un milieu si acide, des conditions optima.

*
**

4° — Destinée de cette ammoniacque.

L'ammoniacque ainsi formée à l'intérieur de la cellule par réduction directe de l'acide nitrique est un corps *très toxique* pour le protoplasme de l'organisme vivant.

Il faut que la cellule, par un moyen approprié se « détoxique ». Et, ainsi que nous l'avons précédemment exposé, dans notre historique, il existe plusieurs moyens pour arriver à ce but.

L'ammoniacque se trouve dans la cellule sous un état :

- a) très réactionnel,
- b) très toxique,
- c) mais aussi très diffusible à travers la membrane cellulaire.

Ainsi la cellule pourra s'en débarrasser :

- 1°) par copulation avec un acide pour former des sels ammoniacaux ;
- 2°) par copulation avec des résidus carbonés à forme acide.
- 3°) par copulation avec des résidus carbonés à forme aminoacide ;
- 4°) enfin tout simplement par exosmose.

Quel est le moyen qu'utilise l'*Aspergillus repens* pour se débarrasser contre cet envahissement ammoniacal toxique ?

Là, encore, nous n'avons pas d'expériences exactement adaptées à ces divers points de vue.

Mais qu'observe-t-on avec notre organisme ?

Nous pouvons résumer rapidement les résultats de nos expériences ainsi que nous l'avons fait aux C. R. (10 et 11) :

« L'ammoniaque apparue dans la cellule y prend un état de dissociation réglé par le pH intérieur. Comme celui-ci se maintient dans une zone faiblement acide, NH^3 doit passer en partie à l'état de molécule non ionisées (NH^4OH) qui s'hydrolysent d'ailleurs en (NH^3) et (H^2O). L'ammoniaque sous la forme (NH^3) acquiert ainsi une certaine tension dans la cellule.

« On sait, d'autre part, que sous cette forme moléculaire, elle est très apte à traverser les pores de l'ultra-filtre que représente la membrane. Il y aura donc une exosmose de (NH^3) qui se poursuivra indéfiniment, car, aussitôt arrivés dans le milieu extérieur, très acide dans le cas envisagé les molécules d' NH^3 s'y dissocient intégralement. La tension de (NH^3) dans la cellule reste aussi constamment plus élevée que dans le milieu extérieur ce qui a pour résultat de provoquer sa sortie au fur et à mesure de sa formation. Le mycélium souffre ainsi d'une véritable faim en azote : il n'augmente pas de poids.

« En milieu neutre ou faiblement acide, les conditions sont tout autres.

« Les premières quantités d'ammoniaque passées dans la solution extérieure ne s'y ionisent que faiblement : la tension de (NH^3) dans ce milieu acquiert vite une valeur assez élevée pour que toute nouvelle exosmose de molécules devienne impossible. Par voie de conséquence, la cellule conserve à sa disposition l'ammoniaque produite et peut aussi effectuer sa synthèse protéique : le mycélium augmente rapidement de poids ». L'ammoniaque ne pouvant sortir de la cellule celle-ci s'en débarrasse en l'utilisant pour sa croissance.

Et c'est ce qui ressort très nettement des deux essais suivants que nous résumons dans le tableau ci-joint :

TABLEAU 101

pH initial	Durée du contact en heures	12	24	48	85	113
1,61	N/NO ³ H disp. (mmgr.).	1,24	0,96	3,52	2,96	3,02
	N/NH ³ apparu (mmgr.).	1,32	0,72	1,88	2,44	2,88
	Poids du mycélium en centigrammes	216	160	173	171	158
	Durée du contact en heures	12	36	60	84	110
4,40	N/NO ³ H disp. (en mg.).	1,60	8,16	17,16	17,32	16,92
	N/NH ³ apparu (en mg.).	0,24	0,40	0,16	0,68	1,28
	Poids du mycélium en centigrammes	215	276	416	368	425

Il s'ensuit que pour la Moisissure étudiée, l'ammoniaque est surtout toxique en milieu alcalin car elle ne peut sortir de la cellule.

Si, dans ces conditions, on n'offre que peu de glucide à la cellule, la copulation des restes carbonés avec l'ammoniaque se fera peu ou pas et la cellule sera intoxiquée.

Par contre, si on offre un excès de glucide, la cellule pourra édifier rapidement son édifice azoté et éliminer l'ammoniaque.

Le mécanisme de défense en milieu alcalin, se trouve donc très certainement dans un phénomène de synthèse.

Au contraire, en milieu acide l'ammoniaque peut sortir et cette extravasation constitue vraisemblablement le mécanisme naturel de protection de la cellule.

BIBLIOGRAPHIE

1. — E. ABDERHALDEN ET P. RONA. — Die Zusammensetzung des Eiweiss von *Aspergillus niger* bei verschiedener Stickstoffquelle, — *Zeist. f. physiol. Chemie.* **46**, p. 179, 1905.
2. — D. BACH. — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. Influence de la réaction du milieu. — *Thèse Doct. Sciences.* Paris — 1925.
3. — D. BACH. — La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation des sels ammoniacaux. — *C. R. Ac. Sc.* **184**, p. 766, 1927.
4. — D. BACH. — La nutrition azotée des Mucorinées. — Assimilation de l'ion nitrique. — *C. R. Ac. Sc.* **185**, p. 1578, 1927.
5. — D. BACH. — Dispositif simple pour mesurer et répartir aseptiquement les liquides stériles. — *Bull. Sc. Pharmacol.* **34**, p. 691, 1927.
6. — D. BACH. — Etudes sur les antiseptiques. I : Mécanisme de l'action antiseptique des acides organiques sur quelques bactéries. — *Bull. Sc. Pharmacol.* **39**, p. 7, 1932.
7. — D. BACH. — Le dosage de l'ammoniaque par entraînement à la vapeur d'eau, dans le vide. — *Bull. Sc. Pharmacol.* **39**, p. 607, 1932.
8. — D. BACH. — Le dosage de l'azote nitrique par la méthode de Devarda. — Application aux milieux biologiques. — *Bull. Sc. Pharmacol.* **40**, p. 459, 1933.
9. — D. BACH. — De l'emploi des mycéliums de Mucédinées dans les recherches de physiologie végétale. La méthode des voiles solides. *Bull. Soc. Chim. biol.* **16**, p. 1.708, 1934.
10. — D. BACH ET J. DESBORDES. — La transformation directe des nitrates en ammoniaque par le mycélium des champignons inférieurs. — *C. R. Ac. Sc.* **197**, p. 1.463, 1933.
11. — D. BACH ET J. DESBORDES. — Action paradoxale du mycélium d'*Aspergillus repens* sur le nitrate d'ammoniaque. — *C. R. Ac. Sc.* **197**, p. 1.772, 1933.
12. — B. BANDISCH ET MAYER. — *Zeist f. physiol. Chemie.* — **89**, p. 175, 1914.
13. — K. BERNHAUER. — *Bioch. Zeitschr.* **177**, p. 86 et 270, 1928.
14. — A. BERTHELOT ET G. AMOUREUX. — Sur l'auto-élimination de l'ammoniaque dans les cultures microbiennes. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* **9**, p. 932, 1927.

15. — W. BRENNER. — Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. — *Centr. f. Bakt.* 2 Abt. **40**, p. 555, 1914.
16. — W. BUTKEWITSCH. — Umwandlung der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. *Jahrb. f. wiss. Bot.* **38**, p. 147, 1903.
17. — R. CESBRON. — Influence de la réaction du milieu sur la germination des spores de quelques Mucorinées. — *Thèse Doct. Pharmac.* 1929.
18. — H. COUPIN. — Sur la nutrition azotée du *Penicillium glaucum*. — *G. R. Ac. Sc.* **185**, p. 963, 1927.
19. — M. IRWIN, — *Journ. Gen. Physiol.* **5**, p. 233, 1922.
20. — GAYNEY. — Soil reaction and the growth off. *Azotobacter*. — *Journ. Agri. Res.* **15**, p. 265, 1918.
21. — G. KLEBS. — Die Bedingungen der Forpflanzung einigen Algen und Pilzen. — *Iena*. 1896.
22. — G. KLEIN. — Nitratassimilation bei Schimmelpilzen. — *Z. f. physiolog. Chem.* **174**, p. 278-283, 1928.
23. — G. KLEIN, A. EIGNER ET H. MÜLLER. Nitratassimilation bei Schimmelpilzen. — *Z. f. physiolog. Chem.* **159**, p. 200, 1926.
24. — J. KLOTZ. — Some aspects of nitrogenous metabolism in fungi. — *Ann. Miss. bot. Gard.* **10**, p. 1, 1923.
25. — S. KOSTYTSCHEW, — *Pflanzenphysiol. I. Berlin*, 1926.
26. — S. KOSTYTSCHEW UND E. TSWETKOWA. — Ueber die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. *Zeits. f. physiol. Chemie.* **111**, p. 171, 1920.
27. — KOPACZEWSKY. — Introduction à l'état colloïdal, 1 vol., Gauthier-Villars, Paris, 1926.
28. — E. LAURENT. — Recherches sur le polymorphisme du *Cladosporium berbarum*. — *Ann. Ins. Pasteur.* **2**, p. 581, 1888.
29. — E. LAURENT. — Recherches sur la valeur comparée des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levure de bière et de quelques autres plantes. — *Ann. Ins. Pasteur.* **3**, p. 362, 1889.
30. — E. LAURENT. — *Bull. de l'Ac. Roy. de Belgique.* — **20**, p. 309, 1890.
31. — E. LAURENT. — Expériences sur la réduction des nitrates par les Végétaux. — *Ann. Ins. Pasteur*, **4**, 1890.
32. — LEGENDRE. — La concentration en ion H⁺ de l'eau de mer. Le pH. — 1 vol., Presses Univ. de France, Paris, 1925.
33. — LEWIS ET RANDALL. — Thermodynamics. — Mac Grarw-Hill New-York. 1923.
34. — J. LOEB. — Proteins and the theory of colloïdal behaviour. New-York, Pps. 1922.
J. LOEB. — Les proteines et la théorie des phénomènes colloïdaux. (Trad. par Mouton), 2 vol, Alcan, Paris, 1925.

35. — T. L. LOO. — On the mutual effects between the plant growth and the change of reaction of the nutrient solution with ammonia salts as the source of nitrogen. *Jap. Jour. of Bot.* **3**, p. 163-203, 1927.
36. — G. MALFITANO. — La protéolyse chez l'*Aspergillus niger*. — *Ann. Ins. Pasteur.* **14**, p. 60, 1900.
37. — M. MANGIN. — Qu'est-ce que l'*Aspergillus glaucus*? — *Ann. Scien. nat. Bot.* **10**, p. 303, 1909.
38. — W. MEVIUS. — Wasserstoffionenkonzentration und Permeabilität bei Kalkfeindlichen gewachsen. — *Zeits. f. Bot.* **16**, p. 641, 1924.
39. — W. MEVIUS. — Die Wirkung der ammonium salze in ihrer Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration I. *Planta (Berl.)* **6**, p. 379, 1928.
40. — W. MEVIUS. — *idem.* — II. *Planta (Berl.)*. **9**, p. 1, 1929.
41. — W. MEVIUS UND I. DIKUSSAR. — Nitrite als N/quellen für höhere Pflanzen ein Beitrage zur Brage nach der Assimilation des Nitrate stickstoffs. *Iahrb. Wiss. Bot.* **73**, p. 4, 1930.
42. — L. MICHAELIS. — Wasserstoffionenkonzentration, 1 vol. *Springer, Berlin*, 1914.
43. — L. MICHAELIS. — Die Wasserstoffionenkonzentration. — *Zweite Auflage, Berlin*, 1922.
44. — J. NIKITINSKY. — Ueber die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. — *Jahr. f. wiss. Botan.* **40**, p. 1, 1904.
45. — W. PFEFFER. — Ueber *Elektron* organischer Nährstoffe. — *Jahr. f. wiss. Botan.* **28**, p. 205, 1895.
46. — D. PRIANISCHNIKOW. — La synthèse des corps amidés aux dépens de l'ammoniaque absorbée par les racines. — *Rev. Gen. Bot.* **25**, p. 5 1913.
47. — D. PRIANISCHNIKOW. — Das NH^3 als Anfangs und Endproduct des Stickstoffumsatzes in den Pflanzen. — *Land Vers Stat.* **90**, p. 267-286, 1922.
48. — D. PRIANISCHNIKOW. — Sur l'assimilation de l'ammoniaque par les plantes supérieures. *Rev. gén. Bot.* **36**, p. 5, 1924.
49. — D. PRIANISCHNIKOW. — Ueber physiologische acidität von NO^3 NH^4 . — *Bioch. Zeitz.* **182**, p. 204-214, 1927.
50. — D. PRIANISCHNIKOW. — Ueber die Ausscheidung von NH^3 durch die Pflanzenwurzeln bei Säurevergiftung. — *Bioch. Zeitz.* **193**, p. 1, 1928.
51. — D. PRIANISCHNIKOW. — Zur Frage nach der Ammoniakern nahrung von höheren Pflanzen. — *Bioch. Zeits.* **207**, 1929.
52. — D. PRIANISCHNIKOW ET V. IVANOVA. — Absorption et excretion de l'ammoniaque par les racines des planches. — *C. R. Ac. Sc. URSS. Leningrad.* — *Ser. A.* **14**, 1929, d'après *Biological Abstracts* n° **18.420**, 1932.

53. — D. PRIANISCHNIKOW ET V. IVANOVA. — Formation d'ammoniaque par réduction des nitrates par les plantes supérieures. — *C. R. Ac. Sc. URSS. Leningrad série A.* **8**, p. 205-209, 1931, d'après *Biological Abstracts* ns **21.551**, 1932.
54. — M. RACIBORSKI. — Ueber die Assimilation der Stickstoffverbindungen durch Pilze. — *Bull. Ac. Sc. Cracovie, Clas. Sc. Mat. et Natur.* p. 747, 1900
55. — K. RIPPEL. — Recherches quantitatives sur l'influence de la concentration en ion H sur l'assimilation azotée chez quelques champignons. — *Archiv. für Mikrob.* **2**, p. 72, 1931.
56. — E. G. RITTER. — Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.* **27**, p. 582, 1909.
57. — E. G. RITTER. — Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.* **29**, p. 570, 1911.
58. — E. G. RITTER. — Ammonitrat und freie Salpetersäure als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — *Bioch. Zeits.* **60**, p. 370, 1914.
59. — E. RITTER. — Materialien zur Physiologie der Schimmelpilze. — Russisch, 1916, d'après *Kostytschew et Tswetkova*.
60. — W. J. ROBBINS. — An isoelectric point for plant tissue and its significance. — *Amer. Journ. of. Bot.* **10**, p. 412, 1923.
61. — W. J. ROBBINS. — Isoelectric point for the mycelium of fungi. — *Journ. of. Gen. Physiol.* **6**, p. 259, 1924.
62. — W. J. ROBBINS. — The isoelectric point for plant tissue and its importance in absorption and toxicity. — *Univ. Missouri. Stud.* **1**, p. 360, 1926.
63. — W. J. ROBBINS AND J. T. SCOTT. — *Journ. Agric. Research.* **21**, p. 385, 1925.
64. — T. SAKAMURA. — Ueber die Kultur von *Aspergillus niger* mit besonderer Rücksicht auf das Puffervermögen der Nährlösung. — *Journ. of. coll., of. Agric., Hokkaido Imper. Univ.* **14**, p. 65, 1924.
65. — T. SAKAMURA. — Weitere Studien über die moderierende Rolle der organischen Salze und des Phosphats bei der Kultur von *Aspergillus niger*. — *Japanese Journ. of. Bota.* **3**, p. 245, 1927.
66. — T. SAKAMURA. — Ueber die Resorption der Salze durch die Pflanzlichen Zellen. — *Ber. Jap. Assoco. Advan. Sci.* **4**, 1929.
67. — T. SAKAMURA. — Die Resorption des ammonium und nitrasticks-toffs durch *Aspergillus Oryzoe*. — *Pl. arch. für Wissen. Botanik.* **11** (4), p. 765, 1930.
68. — T. SAKAMURA UND T. L. LOO. — Über die Beeinflussung des Pflanzenplasmas durch die H-Ionen in verschiedenen Konzentration. Beiträge zur Annahme des isoelektrischen Punktes des Protoplasmas. *Bot. Mag. Tokyo.* **39**, 1925.
69. — TH. SCHLÆSING ET A. MUNTZ. — Recherches sur la nitrification par les ferments organisés. — *C. R. Ac. Sc.* **86**, p. 892, 1878.

70. — A. SHMUK ET V. BALABUKHA. — Réduction des nitrates par les racines des plantes. — *Arb. Kubausch. Landwirtsch. Inst.* **4**, p. 21-40, 1926.
71. — H. TAMIYA. — Studien über die Stoffwechsetphysiologie von *Aspergillus Oryzae* I. — *Acta phytochemica.* **3**, p. 51, 1927.
72. — H. TAMIYA. — Idem II. — *Acta phytochemica.* **4**, p. 134, 1928.
73. — C. TANRET. — Action du nitrate d'ammoniaque sur l'*Aspergillus*. — *C. R. Ac. Sc.* **123**, p. 948, 1896.
74. — C. TANRET. — Action des nitrate, sulfate, chlorydrate et phosphate d'ammoniaque sur l'*Aspergillus niger*. — *Bull. Soc. Chim.* **17**, p. 914, 1896.
75. — F. VLÈS. — Précis de chimie physique — *Paris Vigot*, 1929.
76. — O. WARBURG ET E. NEGELEIN. — Über die Reduktion des Salpetersäure in grünen Zellen. — *Bioch. Zeitsch.* **110**, p. 66, 1920.

Vu : *Le Président du Jury,*
L. LUTZ

Vu : *Le Doyen de la Faculté,*
Paul GUÉRIN

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris
Pour le Recteur, l'Inspecteur de l'Académie,
J. PERRON

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
I — INTRODUCTION	7
II — HISTORIQUE.	
CHAPITRE I ^{er} . — Etude de l'évolution des idées	8
CHAPITRE II. — Position de la question à l'heure actuelle ..	16
CHAPITRE III. — Etude de la dissociation de l'acide nitrique et de l'ammoniaque	26
III — LES METHODES D'ETUDE.	
CHAPITRE I ^{er} . — Les conditions de culture	37
CHAPITRE II. — La méthode des voiles solides	42
CHAPITRE III. — Recherches physiques et chimiques sur la récolte et les liquides de culture	47
IV — PARTIE EXPERIMENTALE.	
<i>Première partie. — Etude de l'assimilation de la molécule nitrique par l'Aspergillus repens.</i>	
CHAPITRE I ^{er} . — Culture de l'Aspergillus repens sur milieu sans azote	55
CHAPITRE II. — Assimilation de NO ³ K par culture directe ..	58
CHAPITRE III. — Assimilation de NO ³ K par la méthode des voiles solides	64
CHAPITRE IV. — Assimilation du nitrate d'ammoniaque par la méthode de culture directe et celle des voiles solides	78
<i>Deuxième partie. — Influence de divers facteurs sur l'assi- milation de la molécule nitrique.</i>	
CHAPITRE I ^{er} . — Influence du Sucre	104
CHAPITRE II. — Influence de la proteolyse préalable	113
CHAPITRE III. — Influence de la dose des nitrates	120
CHAPITRE IV. — Influence de la température	125
CHAPITRE V. — Influence de la pression osmotique	128
<i>Troisième partie. — Etude de l'assimilation de la molécule nitrique par différents organismes inférieurs.</i>	
CHAPITRE I ^{er} . — Etude de quelques Mucorinées	137
CHAPITRE II. — Etude de quelques Périssporiacées	158
CHAPITRE III. — Etude de quelques Hyphomycetes	167
V. — CONCLUSIONS GENERALES	170
VI. — BIBLIOGRAPHIE	177

ERRATUM

Page 7 (Introduction) lire « *Aspergillus repeus* » au lieu de « *Aspergillus Repens* ».

Page 68, le mot sucre doit être placé à droite du tableau en dehors de l'accolade.

Page 169, neuvième ligne, lire « *Cunninghamella* » au lieu de « *Cunnuinyhamella* ».

Page 169, quatorzième ligne, lire « *cineria* » au lieu de « *cinneria* ».

